

**UNTERSUCHUNGEN
ZUR BIOCHEMIE UND IMMUNOGENITÄT
DER ZELLOBERFLÄCHE VON VERTRETEREN
DER GATTUNGEN
LISTERIA UND STAPHYLOCOCCUS -
ZWEI GATTUNGEN MIT HUMAN-
UND TIERPATHOGENEN ORGANISMEN**

Gerhard Josef Ruhland

Disbui. München

1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555421_0007

UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOCHEMIE UND IMMUNOGENITÄT DER
ZELLOBERFLÄCHE VON VERTRETERN DER GATTUNGEN
LISTERIA UND STAPHYLOCOCCUS -
ZWEI GATTUNGEN MIT HUMAN- UND TIERPATHOGENEN
ORGANISMEN

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Gerhard Josef Ruhland
aus
München

September 1988

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Fiedler
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rüdiger
- Tag der mündlichen Prüfung: 06.12.1988

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstr. 15, Tel. 288663

ABKÜRZUNGEN

Ala	Alanin
ASA	Aminosäurenanalysator
B.	Bacillus
¹⁴ C	radioaktiver Kohlenstoff
CMP u. CDP	Cytidinmono- u. Cytidindiphosphat
cpm	Impulse pro Minute
D	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE-	Diethylaminoethyl-
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNP-	Dinitrophenyl-
FDNB	2,4-Fluordinitrobenzol
Gal	Galactose
GalN	Galactosamin
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
GC	Gaschromatograph(ie)
G+C-Gehalt	Guanin und Cytosin-Gehalt
Glc	Glucose
GlcN	Glucosamin
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
Gro	Glycerin
h	Stunde (n)
HD	Hefe-Dextrose
KDO	2-Keto-3-Desoxyoctonsäure
L.	Listeria
Lb.	Lactobacillus
LPS	Lipopolysaccharid
Lys	Lysin
M	molar
Mr	apparentes Molekulargewicht
Man	Mannose
ManNac	N-Acetylmannosamin

Mat	Mannit
m-DAP	meso-Diaminopimelinsäure
MG	Molekulargewicht
min	Minute (n)
MurNAc	N-Acetylmuraminsäure
OD	optische Dichte
P	Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
R _f -Wert	relativer Distanzwert
Rha	Rhamnose
Rit	Ribit
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
S.	Staphylococcus
Sc.	Streptococcus
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
Ser	Serin
SV	Serovarietät
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UMP u. UDP	Uridinmono- u. Uridindiphosphat

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 EINLEITUNG	1
1.1 Struktur und Organisation der Zelloberfläche von Eubakterien	1
1.2 Funktionen und biologische Aktivitäten von Polymeren der Zelloberfläche	15
1.3 Einfluß von Wachstumsbedingungen auf die Zusammensetzung und Struktur der Zelloberfläche	21
1.4 Die Gattungen Listeria und Staphylococcus	23
1.5 Untersuchungsziele dieser Arbeit	34
2 MATERIAL UND METHODEN	35
2.1 Bakterienstämme	35
2.2 Nährmedien und Anzuchtbedingungen	37
2.3 Zellernte	41
2.4 Aufschluß der Zellen	41
2.5 Präparation von Zellwänden und Zellmembranen	41
2.5.1 Tryptisch verdaute Zellwände	41
2.5.2 Natriumdodecylsulfat (SDS)-Behandlung von Zellwänden	42
2.5.3 Zellmembranen	42
2.6 Präparation von Teichonsäuren	42
2.7 Präparation von Lipoteichonsäuren	42
2.8 Präparation von Lipopolysacchariden	43
2.9 Präparation von Exoproteinen	43
2.9.1 Exoproteine von Kulturen auf festem Nährboden	43
2.9.2 Exoproteine von Kulturen in Flüssigmedium	44
2.9.2.1 Anzucht in Dialyseschläuchen	45
2.9.2.2 Anzucht in ultrafiltriertem Medium	46

	Seite
2.10 Hydrolysebedingungen	46
2.10.1 Hydrolysen mit Fluorwasserstoffsäure	46
2.10.2 Hydrolysen mit Salzsäure	46
2.10.3 Alkalische Hydrolyse von Lipiden	47
2.10.4 Alkalische Hydrolyse von Teichonsäuren	47
2.10.5 Hydrolyse von Alaninestern	47
2.11 Chromatographische Methoden	47
2.11.1 Flüssigchromatographie	47
2.11.1.1 Gelfiltration	48
2.11.1.2 Affinitätschromatographie	48
2.11.1.3 Anionenaustauschchromatographie	49
2.11.1.4 Ionenaustauschchromatographie zur Neutralisation und Entsal- zung von Proben	49
2.11.2 Gaschromatographie	50
2.11.2.1 Gaschromatographie von Zuckern	50
2.11.2.2 Gaschromatographie von Fettsäuren	53
2.11.3 Dünnschichtchromatographie	55
2.11.3.1 Analytische Dünnschichtchroma- tographie	55
2.11.3.2 Präparative Dünnschichtchroma- tographie	56
2.11.4 Aminosäurenanalysator	57
2.12 Gelelektrophoretische Methoden	57
2.12.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	57
2.12.1.1 SDS-PAGE von Proteinen	57
2.12.1.2 SDS-PAGE von Lipopolysacchariden	58
2.12.1.3 SDS-PAGE von Lipoteichon- und Teichonsäuren	58
2.12.2 Agarose-Gelelektrophorese	59
2.12.3 Isoelektrische Fokussierung	60
2.12.4 Färbung von Gelen	60
2.12.4.1 Coomassie-Färbung	60
2.12.4.2 Silbernitrat-Färbung	60

	Seite
2.12.4.3 Phosphatfärbung mit "Stains-All"	61
2.12.4.4 Periodsäure-Silber-Färbung	61
2.13 Analytische Nachweismethoden	61
2.13.1 Bestimmung von Glycerin	61
2.13.2 Bestimmung von Glucose	61
2.13.3 Bestimmung von Galactose	61
2.13.4 Bestimmung von Neutralzuckern	62
2.13.5 Bestimmung von Phosphat	62
2.13.6 Bestimmung von 2-Keto-3-Desoxyocton- säure (KDO)	62
2.13.7 Bestimmung von Uronsäure	63
2.14 Enzymatische Behandlungen	63
2.14.1 Alkalische Phosphatase	63
2.14.2 Glycohydrolasen	63
2.14.3 D-Aminosäure-Oxidase	64
2.15 Periodat-Oxidation	65
2.16 Immunologische Methoden	65
2.16.1 Herkunft der O-Antiseren	65
2.16.2 Titerbestimmung von O-Antiseren	66
2.16.3 Ouchterlony-Immundoppeldiffusion	66
2.16.4 Immunoblotting	66
2.17 Verschiedene Methoden	67
2.17.1 Dialysen	67
2.17.2 Ultrafiltration	67
2.17.3 Sterilfiltration	68
2.17.4 Präparation von Glycolipiden	68
2.17.5 Fällung von Proteinen mit Trichloressig- säure (TCA)	68
2.17.6 Dinitrophenylierung von Zellwänden	68
2.17.7 Radioaktivitätsmessung	69
2.17.8 Bestimmung der Lipoteichonsäure-Carrier- Aktivität (LTC-Aktivität)	69
2.17.9 Elektronenmikroskopie	69

3 ERGEBNISSE

71

3.1 Vorkommen und Struktur von Lipoteichonsäuren in der Gattung <i>Listeria</i>	71
3.1.1 Nachweis und Reinigung der Lipoteichon- säuren	71
3.1.2 Qualitative und quantitative Zusammen- setzung der Lipoteichonsäuren	73
3.1.3 Strukturanalyse der Lipidanteile der Lipoteichonsäuren	77
3.1.4 Kettenlänge der Lipoteichonsäuren und Substitution von Glycerinresten	82
3.1.5 "Lipoteichonsäure-Carrier-Aktivität" der Lipoteichonsäuren	84
3.1.6 Zusammenfassung der Ergebnisse	84
3.2 Untersuchungen zur Struktur der Teichonsäuren von <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115, <i>L. innocua</i> ATCC 33090 und <i>L. innocua</i> ATCC 33091	86
3.2.1 Reinigung der Teichonsäuren	86
3.2.2 Qualitative und quantitative Zusammen- setzung der Teichonsäuren	88
3.2.3 Auftrennung von HF-Bruchstücken der Tei- chonsäuren durch Gelfiltration	89
3.2.4 Auftrennung von HF-Bruchstücken der Tei- chonsäuren durch Dünnschichtchromato- graphie	93
3.2.5 Glycohydrolasebehandlung von HF-Bruch- stücken der Teichonsäuren	96
3.2.6 Periodatbehandlung der Teichonsäuren und ihrer Bruchstücke	99
3.2.7 Untersuchungen zur Verknüpfungsweise der Teichonsäureeeinheiten über Phosphodies- terbindungen	101
3.2.8 Zusammenfassung der Ergebnisse	103

	Seite
3.3 Untersuchungen zur Immunogenität von Lipo- teichon- und Teichonsäuren verschiedener Listeria-Stämme	105
3.3.1 Agglutination von L. innocua-Zellen (ATCC 33090) mit Streptokokken-Gruppen- serum	105
3.3.2 Immundoppeldiffusion von O-Anti-Listeria- Seren gegen Lipoteichon- und Teichon- säuren verschiedener Listeria-Stämme	107
3.4 Untersuchung von L. monocytogenes ATCC 19115 auf Lipoteichon-, Teichon- und Teichuronsäure bei Kultivierung in einem synthetischen Medium (MOPSS _u pp _l .-Medium) unter Phosphatmangel	114
3.4.1 Wachstum von Listeria-Stämmen auf synthe- tischem Medium (MOPSS _u pp _l .-Medium)	114
3.4.2 Untersuchung von L. monocytogenes ATCC 19115 auf Teichuron- bzw. Teichonsäure bei Kultivierung in MOPSS _u pp _l .-Medium unter Phosphatmangel	117
3.4.3 Untersuchung von L. monocytogenes ATCC 19115 auf Lipoteichonsäure bei Kultivie- rung in MOPSS _u pp _l .-Medium unter Phos- phatmangel	119
3.5 Untersuchung von Listeria-Stämmen auf das Vor- kommen von Lipopolysacchariden	122
3.5.1 Präparation von Lipopolysacchariden durch Phenolextraktion und hydrophobe Chromato- graphie an Octyl-Sepharose	123
3.5.2 Versuch der Präparation von Lipopolysac- chariden aus Listeria-Stämmen mit Hilfe der Chromatographie an Octyl-Sepharose	128
3.5.3 Nachweis von Lipopolysacchariden durch SDS-PAGE	132
3.6 Untersuchung von Listeria-Stämmen auf Zell- oberflächenproteine	134



3.6.1 Untersuchung der Zellwand von <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115 auf kovalent gebundene Proteine	134
3.6.2 Untersuchung von SDS-extrahierten Proteinen aus Zellen durch PAGE	134
3.6.3 Vergleich der Proteinmuster von Rohzellwänden und Zellmembranen durch SDS-PAGE	136
3.7 Untersuchung von <i>Listeria</i> -Stämmen auf Exoproteine	138
3.7.1 Präparation der Exoproteine von Kulturen auf festem Nährboden	138
3.7.2 Präparation der Exoproteine von Flüssigkulturen in Dialyseschläuchen zur Erstellung einer Kinetik der Exoproteinproduktion	140
3.7.3 Präparation der Exoproteine von Kulturen in ultrafiltriertem Medium	146
3.7.4 Nachweis der Antigenität der Exoproteine durch Immunoblotting	148
3.8 Vorkommen und Struktur von Lipoteichonsäuren in der Gattung <i>Staphylococcus</i>	152
3.8.1 Nachweis und Reinigung der Lipoteichonsäuren	152
3.8.2 Qualitative und quantitative Zusammensetzung der Lipoteichonsäuren	154
3.8.3 Strukturanalyse der Lipidanteile der Lipoteichonsäuren	157
3.8.4 Nachweis der Lipoteichonsäuren durch Gelelektrophorese	159
3.8.5 Zusammenfassung der Ergebnisse	160
3.9 Untersuchung von Vertretern verschiedener Gattungen Gram-positiver Bakterien auf das Vorkommen von Lipoteichonsäuren oder anderen amphiphilen Polymeren	161

	Seite
3.9.1 Nachweis und Reinigung der amphiphilen Polymere	161
3.9.2 Gaschromatographische Untersuchung der isolierten amphiphilen Polymere	162
3.10 Biochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Zelloberfläche von pathogenen und nicht-pathogenen Staphylococcus-Stämmen bei Anzucht in Human-Blutplasma und HD-Medium	165
3.10.1 Anzucht von Staphylokokken in Human-Blutplasma	165
3.10.2 Untersuchung von S. aureus H auf Lipoteichonsäure bei Anzucht in Human-Blutplasma	166
3.10.3 Biochemischer Vergleich der Zellwandzusammensetzung von in Human-Blutplasma und HD-Medium angezogenen Staphylokokken	167
3.10.4 Elektronenmikroskopische Untersuchung von in Human-Blutplasma und HD-Medium angezogenen Staphylokokken	172
4 DISKUSSION	183
4.1 Biochemie und Immunogenität von Zelloberflächenkomponenten in der Gattung Listeria und ihre Bedeutung für die serologische Klassifizierung und Pathogenität	183
4.2 Vorkommen, Struktur, taxonomische und phylogenetische Relevanz von Lipoteichonsäuren bei den Gattungen Listeria und Staphylococcus sowie Vertretern anderer Verwandtschaftsgruppen Gram-positiver Bakterien	200

	Seite
4.3 Einfluß von veränderten Wachstumsbedingungen auf die Zusammensetzung der Zelloberfläche von Listerien und Staphylokokken	207
5 ZUSAMMENFASSUNG	212
6 LITERATURVERZEICHNIS	215

1 EINLEITUNG

1.1 Struktur und Organisation der Zelloberfläche von Eubakterien

Das Cytoplasma sämtlicher Zellen ist nach außen hin von einer semipermeablen Membran, der Cytoplasmamembran, begrenzt, die den Stoffaustausch zwischen den Zellen und der Umgebung reguliert. Bei Eubakterien ist der Protoplast mit wenigen Ausnahmen (z. B. Mollicutes und L-Phasen) von einer Zellwand umgeben. Sie verleiht den Zellen ihre charakteristische Form und schützt sie vor einem osmotisch bedingten Platzen in hypotonischen Medien.

Nach bisherigen Erkenntnissen können bei Eubakterien mindestens sieben verschiedene Zellwandtypen, die in Abbildung 1 dargestellt sind, unterschieden werden.

In den meisten Fällen, ausgenommen die Gattungen *Chlamydia* und *Planctomyces*, enthalten die Zellwände ein rigides "Stützskelett", das sogenannte Peptidoglycan oder Murein. Charakteristisch für die Zellwand Gram-negativer Bakterien ist ein sehr dünnes Peptidoglycan (2-3 nm), das nur ca. 10 % des Zellwandtrockengewichts ausmacht und von einer "äußeren Membran" umhüllt ist. Gram-positiven Bakterien fehlt mit Ausnahme von Vertretern der Gattung *Deinococcus* eine "äußere Membran". Das Peptidoglycan ist jedoch wesentlich dicker (bis zu 50 nm) als bei den Gram-negativen Bakterien.

Die biochemische Zusammensetzung des Peptidoglycans wurde vergleichend sehr gut und umfassend untersucht (Schleifer und Kandler, 1972). Es besteht aus linearen Glycansträngen, die über kurze Peptide zu einem sackförmigen Makromolekül, dem sogenannten Mureinsacculus, vernetzt sind (Weidel und Pelzer, 1964). Der Glycananteil setzt sich in allen Fällen aus alternierenden, β (1-4)-verknüpften N-Acetylglucosamin- und N-Acetylmuraminsäureresten zusammen. An den Carboxylgruppen der Muraminsäurereste substituiert jeweils ein

Oligopeptid, das L- und D-Aminosäuren in abwechselnder Reihenfolge enthält.

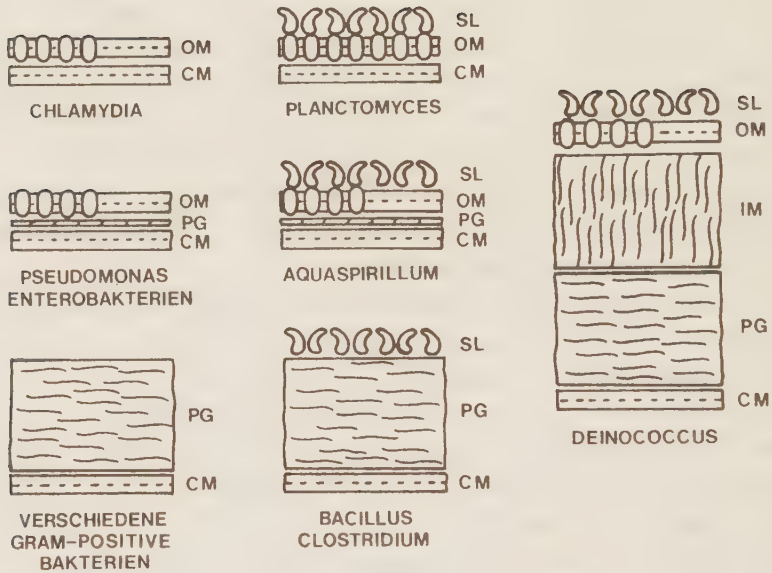


Abbildung 1:

Schematische Darstellung der bisher bekannten Zellwandtypen bei Eubakterien (Engelhardt, 1988).

CM: Cytoplasmamembran; PG: Peptidoglycan; OM: Äußere Membran; SL: "Surface-Layer"; IM: "intercalating material"

Bei allen Gram-negativen Bakterien, mit Ausnahme der Spirochaeten, weisen die Peptiduntereinheiten die Sequenz L-Alanin, D-Glutaminsäure, meso-Diaminopimelinsäure und D-Alanin auf. Eine Quervernetzung der Peptiduntereinheiten erfolgt immer direkt, ohne Beteiligung weiterer Aminosäuren (Abbildung 2).

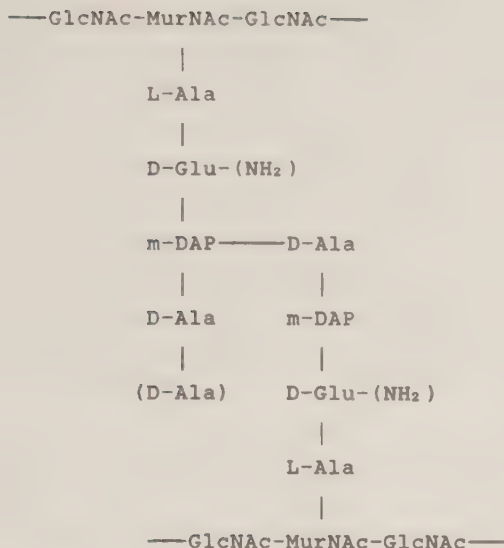


Abbildung 2:

Ausschnitt der Primärstruktur des für Gram-negative Bakterien typischen Peptidoglycans (Typ A1 α ; Schleifer und Kandler, 1972).

Gram-positive Bakterien hingegen weisen bezüglich der Aminosäurezusammensetzung ihrer Mureine und der Art der Quervernetzung eine außerordentliche Variabilität auf. Innerhalb einer Verwandtschaftsgruppe stellt die Mureinstruktur jedoch ein stabiles taxonomisches Merkmal dar (Schleifer und Kandler, 1972). Häufig sind die Oligopeptide, wie am Beispiel von *S. aureus* in Abbildung 3 dargestellt, über Interpeptidbrücken verknüpft.

Die "äußere Membran" der Gram-negativen Bakterien (Abbildung 1) besteht aus einem "Lipid-Protein-Bilayer", der neben Phospholipiden und Proteinen das Lipopolysaccharid und Lipoprotein enthält. Die Lipoproteinmoleküle verknüpfen das Murein kovalent mit der Innenseite der "äußeren Membran".

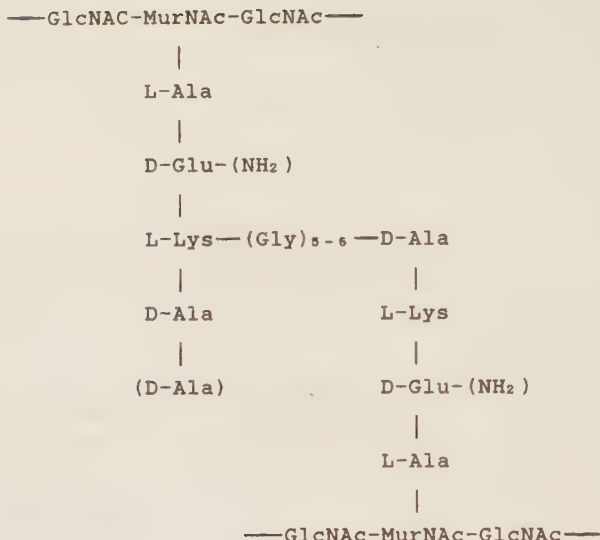


Abbildung 3:

Ausschnitt der Primärstruktur des Peptidoglycans von *S. aureus* (Typ A3 α ; Schleifer und Kandler, 1972).

Das Lipopolysaccharid (LPS) ist mit seinem Lipidanteil, dem Lipid A, ausschließlich in der äußeren Membranschicht verankert. Kovalent verbunden mit dem Lipid A ist der Polysaccharidanteil des LPS, der sich aus einer Kernregion und der O-antigenen Seitenkette zusammensetzt. Während die Struktur des Lipidanteils weitgehend konserviert ist, treten Variationen in der Kernregion und vor allem in den O-antigenen Seitenketten auf. Charakteristische Komponenten von Lipopolysacchariden sind 2-Keto-3-Desoxyoctonsäure (KDO), Hydroxymyristinsäure, Ethanolamin und Heptosen (Lüderitz et al., 1982).

Bei einigen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien bilden sogenannte S-Layer (Surface-Layer) die äußerste Zellwandschicht (Abbildung 1). Es handelt sich dabei um eine

geschlossene Hülle, die fast ausnahmslos von einem regelmäßig angeordneten Oberflächenprotein gebildet wird (Engelhardt, 1988). Im Gegensatz zu den S-Layern gelten Schleimkapseln, die bei vielen Eubakterien auftreten, nicht als Bestandteile der Zellwand. Unter Kapseln versteht man ein mehr oder weniger loses, stark hydratisiertes Material, das den Zellwänden aufgelagert ist und aus Polysacchariden (z. B. *Streptococcus* und *Enterobacteriaceae*) oder Polypeptiden (z. B. *Bacillus*) besteht. Der Besitz einer Kapsel erhöht die Resistenz pathogener Bakterien gegenüber Phagocytose und damit ihre Virulenz.

Die Zellwände Gram-positiver Bakterien enthalten neben dem Peptidoglycan und den S-Layer-Polypeptiden, die bisher nur vereinzelt nachgewiesen wurden, eine Reihe weiterer Komponenten, unter anderem Proteine mit unterschiedlichen Funktionen. Autolytische Enzyme sind vermutlich generell im Peptidoglycan vorzufinden. Im Fall von *Streptococcus cremoris* wurden Zellwand-assoziierte Proteasen nachgewiesen (Hugenholtz et al., 1987). Bei vielen Stämmen von *S. aureus* kommt das kovalent mit dem Murein verknüpfte Protein A vor, das den Fc-Anteil von Immunglobulin G binden kann (Sjöquist et al., 1972). Die M-Proteine von Streptokokken der Gruppe A sind ebenfalls an der Zelloberfläche lokalisiert und stellen wichtige Virulenzfaktoren dar (siehe 1.2).

Charakteristisch für die Zellwände Gram-positiver Bakterien sind vor allem akzessorische Polymere wie Teichonsäuren, Teichuronsäuren und Polysaccharide, die kovalent mit dem Peptidoglycan verknüpft sind. Bei den meisten bisher untersuchten Gram-positiven Bakterien wurden außerdem amphiphile Polymere (häufig Lipoteichonsäuren) nachgewiesen, die mit dem Lipidanteil in der Cytoplasmamembran verankert sind, während der hydrophile Teil nach außen ragt. Wie in Abbildung 4 dargestellt ist, können sowohl die akzessorischen Zellwandkomponenten (z. B. Teichonsäuren) als auch die amphiphilen Polymere (z. B. Lipoteichonsäuren) das Peptido-

glycannetzwerk durchdringen und sind so an der Zelloberfläche immunologisch nachweisbar (Knox und Wicken, 1973).



Cytoplasmamembran



Peptidoglycan



Oberflächenprotein



Autolytisches Enzym



Teichonsäure,
Teichuronsäure od.
Polysaccharid

Amphiphiles Polymer

Abbildung 4:

Schematische Darstellung der Zelloberfläche Gram-positiver Bakterien.

S-Layer, die in einigen Fällen vorhanden sind, wurden nicht berücksichtigt.

Teichonsäuren wurden erstmals 1958 als kovalent mit dem Peptidoglycan verknüpfte Komponenten entdeckt (Armstrong et al., 1958 und 1959). Zunächst wurden mit dem Begriff Teichonsäure lineare Poly(Glycerinphosphat)- oder Poly-(Ribitphosphat)-Polymere bezeichnet, deren Glycerin- bzw. Ribitreste über Phosphodiester verknüpft und zum Teil mit estergebundenem D-Alanin substituiert sind. In vielen Fällen konnten glycosidisch gebundene Zucker oder Aminosucker als

zusätzliche Substituenten nachgewiesen werden. Die durchschnittliche "Kettenlänge" dieser Polymere in intakten Zellen wird auf 35-40 Polyolphosphatereinheiten geschätzt. Durch umfassende Untersuchungen an einer Vielzahl Gram-positiver Bakterien verschiedener Gattungen stellte sich eine weitaus größere Strukturvariabilität bei Teichonsäuren heraus. Bei einigen Vertretern coryneformer Bakterien kommen Poly(Mannitphosphat)-Teichonsäuren (Anderton und Wilkinson, 1980 und 1985; Fiedler et al., 1981) oder Poly(Erythritphosphat)-Teichonsäuren (Fiedler, unveröffentlichte Daten) vor. Neben den klassischen Poly(Polyolphosphat)-Teichonsäuren wurden Polymere entdeckt, bei denen Glycosylreste oder Glycosyl- und Polyolreste über Phosphodiesterbindungen zu einer Kette verknüpft sind.

Nach den bisherigen Erkenntnissen können Teichonsäuren in vier unterschiedliche Strukturtypen eingeteilt werden:

- (I) Poly(Polyolphosphat)-Typ
Polyol = Glycerin, Ribit, Mannit oder Erythrit
- (II) Poly(Glycosyl-Polyolphosphat)-Typ
Polyol = Glycerin oder Ribit
- (III) Poly(Polyolphosphat-Glycosylphosphat)-Typ
Polyol = Glycerin
- (IV) Poly(Glycosylphosphat)-Typ

Einige Beispiele für die hier dargestellten Teichonsäurestrukturtypen sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Teichonsäuren weisen häufig innerhalb einer taxonomischen Gruppe von Bakterien - z. B. bei Staphylokokken - eine große strukturelle Diversität auf. Strukturmerkmale von Teichonsäuren sind deshalb zur Differenzierung von Arten oder Gattungen meistens ungeeignet (Fiedler und Schäffler, 1987). Das Vorkommen von Teichonsäuren stellt jedoch in einigen Verwandtschaftsbereichen ein stabiles chemotaxonomisches Merkmal dar. Dies zeigen umfangreiche Untersuchungen bei den Gattungen *Brevibacterium* (Fiedler et al., 1981), *Staphylo-*

coccus (Endl et al., 1983) und *Listeria* (Fiedler et al., 1984) sowie bei Stämmen der "*Arthrobacter nicotianae*-Gruppe" (Fiedler und Schäffler, 1987).

Bei einigen Gram-positiven Bakterien wurden Teichuronsäuren als sekundäre Zellwandpolymere entdeckt. Mit dem Begriff Teichuronsäure werden anionische Polymere bezeichnet, die im Gegensatz zu Teichonsäuren keine Phosphodiester, sondern Uronsäuren enthalten. In *B. licheniformis* 6346 wurde erstmals eine Teichuronsäure zusammen mit einer Teichonsäure als Bestandteil der Zellwand nachgewiesen (Janczura et al., 1961). Diese Teichuronsäure wurde als ein Polymer aus D-Glucuronsäure und N-Acetylgalactosamin charakterisiert. In *Micrococcus luteus* fehlt eine Teichonsäure vollständig, statt dessen ist eine Poly[-4)-N-Acetylmannosaminuronosyl-(β 1-6)Glucosyl(α 1-)]-Teichuronsäure vorhanden (Perkins, 1963; Nasir-ud-din und Jeanloz, 1976). *B. subtilis* var. *niger* synthetisiert Teichuronsäure nur bei Kultivierung unter Phosphat-limitierten Bedingungen (Ellwood und Tempest, 1969 und 1972). Zellen, die in kontinuierlicher Kultur unter Phosphatmangelbedingungen angezogen wurden, stellten die Teichonsäurebiosynthese ein und produzierten statt dessen Teichuronsäure.

Tabelle 1: (Seite 9)

Strukturen von Teichonsäuren bei verschiedenen Gram-positiven Bakterien (n = Kettenlänge).

^aD-Alanylsubstituenten wurden nicht berücksichtigt.

^bReferenzen:

- (1), Armstrong et al., 1961; (2), Knox und Wicken, 1971;
- (3), Anderton und Wilkinson, 1985; (4), Baddiley et al., 1961 und 1962; (5), Fiedler und Steber, 1984; (6), Kojima et al., 1985c; (7), De Boer et al., 1978; (8), Endl et al., 1983

Typ	Organismus	Grundstruktur der Teichonsäurekette	Substituenten ^a	Ref. ^b
I	<i>B. subtilis</i> W23	-[-1-Rit-5-P-] _n -	β-Glc	1
	<i>Lb. helveticus</i> NCIB 8025	-[-1-Gro-3-P-] _n -	α-Glc	2
	<i>Brevibacterium</i> iodinum	-[-1-Mat-6-P-] _n -	Pyruvat, β-Glc	3
	<i>S. aureus</i> H	-[-1-Rit-5-P-] _n -	α- u. β-GlcNac	4
	<i>S. xylosus</i> DSM 20266	-[-1-Gro-3-P-] _n -	α-GlcNac	5, 8
		u. -[-1-Rit-5-P-] _n -	β-GlcNac	
II	<i>B. coagulans</i> AHU 1631	-[-6-Gal(α1-2)Gro-3(1)-P-] _n -	β-Glc	6
	<i>B. stearothermophilus</i> B65	-[-6-Glc(α1-1,3)Gro-3(1)-P-] _n -		7
III	<i>S. sciuri</i> DSM 20352	-[-GlcNac-1-P-Gro-P-] _n -	β-GlcNac	8
IV	<i>S. auricularis</i> ATCC 33753	-[-6-GlcNac-1-P-] _n -		8

Tabelle 1:
(Legende: Seite 8)

Bei vielen Gram-positiven Bakterien sind neutrale Polysaccharide kovalent mit dem Peptidoglycan verknüpft. Zellwandpolysaccharide spielen eine wichtige Rolle bei der serologischen Klassifizierung von Streptokokken (Lancefield, 1941). Streptokokken der Gruppe A sind zum Beispiel durch ein Polysaccharid aus Rhamnose und N-Acetylglucosamin charakterisiert (Krause und McCarty, 1961). Bei Streptokokken der Gruppe C enthält das Gruppen-spezifische Polysaccharid N-Acetylgalactosamin anstelle von N-Acetylglucosamin (Krause und McCarty, 1962). Ein Zellwandpolysaccharid, das sich aus Galactose, N-Acetylglucosamin, Rhamnose und N-Acetylglucosamin zusammensetzt, wurde in dem Fisch-pathogenen Bakterium *Renibacterium salmoninarum* nachgewiesen (Kusser und Fiedler, 1983; Fiedler und Draxl 1986).

Ein saures Polysaccharid, das aus "repeating units" der Struktur $-4)\text{GlcNAc}(\alpha 1-3)\text{Rha}(\alpha 1-3)\text{Gal}(\alpha 1-4)[\text{sn-Gro-1-P-2}]\text{Rha}(\alpha 1-$ besteht, ist im Falle von *B. cereus* AHU 1356 kovalent mit dem Peptidoglycan verknüpft (Kojima et al., 1985b). Im Gegensatz zu den Teichonsäuren stellen die Glycerinphosphatreste keine integralen Bestandteile der polymeren Kette dar, sondern substituieren an Rhamnosylresten des Polysaccharidstranges. Studien zur Biosynthese des Polysaccharids ergaben, daß die Glycerinphosphatreste vermutlich nicht wie im Fall der Teichonsäuren von CDP-Glycerin (Ward, 1981), sondern von Phosphatidylglycerin stammen (Kojima et al., 1985b).

Die Verknüpfung sämtlicher sekundärer Zellwandpolymere mit dem Peptidoglycan erfolgt vermutlich über eine Phosphodiesterbindung zwischen dem Polymer und der Hydroxylgruppe am C₆-Atom eines Muraminsäurerestes. Für Teichon- und Teichuronsäuren wurden sogenannte "linkage units" nachgewiesen, die eine Anbindung der Polymere an das Murein vermitteln. Im Fall von *S. aureus* H sind die Teichonsäureketten jeweils mit dem endständigen Glycerinrest einer "linkage unit" der Struktur $(\text{Gro-P})_3\text{-ManNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc}$

Phosphodiester-verknüpft (Kojima et al., 1985a). Die Verbindung mit dem Peptidoglycan erfolgt über eine Phosphodiesterbindung zwischen dem C₁-Atom des terminalen N-Acetylglucosamins der "linkage unit" und der C₆-Position eines Muraminsäurerestes.

Viele Gram-positive Bakterien besitzen Lipoteichonsäuren als Komponenten der Cytoplasmamembran. Lipoteichonsäuren bestehen aus einer Teichonsäurekette, die kovalent mit einem Lipidanteil (Lipidanker) verknüpft ist. Die ursprünglich als "intrazelluläre" Teichonsäuren (Baddiley und Davison, 1961) oder Membranteichonsäuren bezeichneten Polymere sind mit ihrem Lipidanteil über hydrophobe Wechselwirkungen in der Außenseite der Cytoplasmamembran verankert. Der hydrophile Anteil, in der Regel eine Poly(Glycerinphosphat)-Kette, ragt nach außen und durchdringt die Zellwandmatrix (Lambert et al., 1977). Die Glycerinreste der Teichonsäureketten können in unterschiedlichem Ausmaß mit estergebundenen D-Alaninresten substituiert sein; häufig tritt eine zusätzliche Substitution mit Zucker- und/oder Aminozuckerresten auf. Der Lipidanker besteht üblicherweise aus einem Glyco- oder Phosphatidylglycolipid, das auch als freies Lipid in der Cytoplasmamembran vorkommt (Button und Hemmings, 1976; Fischer, 1981). Die Struktur einer typischen Lipoteichonsäure ist am Beispiel von *S. aureus* H in Abbildung 5 wiedergegeben. Die Poly(Glycerinphosphat)-Kette, deren Glycerinreste 1,3-verknüpft und zu etwa 50 % mit D-Alanin verestert sind, ist kovalent an Gentiobiosyl-Diacylglycerin gebunden (Duckworth et al., 1975).

Eine Lipoteichonsäure ungewöhnlicher Struktur kommt bei dem Stamm *Streptococcus lactis* Kiel 42172 vor, der kürzlich als *Lactococcus garviae* neu klassifiziert wurde (Schleifer et al., 1985). Die hydrophile Kette enthält neben Glycerinphosphat Digalactosylreste als integrale Bestandteile (Koch und Fischer, 1978).

Verschiedene Strukturen von Lipoteichonsäuren sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

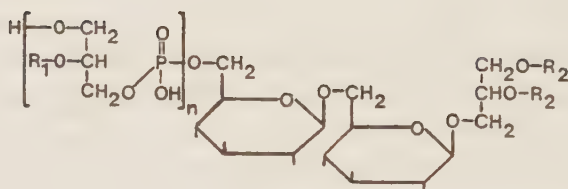


Abbildung 5:

Struktur der Lipoteichonsäure von *S. aureus* H (Duckworth et al., 1975).

R₁: D-Alanyl- oder H-

R₂: Fettsäurerest

n: Kettenlänge (20-28)

Tabelle 2: (Seite 13)

Strukturen von Lipoteichonsäuren bei verschiedenen Gram-positiven Bakterien (n = Kettenlänge).

^aReferenzen:

- (1), Duckworth et al., 1975; (2), Nakano und Fischer, 1978;
- (3), Fischer et al., 1980b; (4), Fischer et al., 1978;
- (5), Button und Hemmings, 1976; (6), Toon et al., 1972;
- (7), Fischer et al., 1980a; (8), Koch und Fischer, 1978;
- (9), Fischer und Koch, 1981; (10), Ganfield und Pieringer, 1975

Organismus	Lipidanteil		Hydrophile Kette		Ref. 1
	Struktur	Struktur	Struktur	Substitution	
<i>S. aureus</i> H	Glc(β1-6)Glc(β1-3)Acyl ₂ Gro	(GroP) _n	20-28	D-Ala	1
<i>Lb. casei</i>	Glc(β1-6)Gal(α1-2), Acyl+6Glc(α1-3)Acyl ₂ Gro Glc(β1-6)Gal(α1-2)Glc(α1-3)Acyl ₂ Gro	(GroP) _n	40	D-Ala	2
<i>Lb. helveticus</i>	Glc(β1-6)Gal(α1-2), Acyl+6Glc(α1-3)Acyl ₂ Gro Glc(β1-6)Gal(α1-2)Glc(α1-3)Acyl ₂ Gro	(GroP) _n	24	D-Ala	3
<i>B. subtilis</i> W 23	Glc(β1-6)Glc(β1-3)Acyl ₂ Gro	(GroP) _n		D-Ala, Glc, GlcNAc	4, 9
<i>B. licheniformis</i> 6346 MH-5	Acyl ₂ Gro	(GroP) _n	32-40	D-Ala, GlcNAc	5
<i>Sc. faecalis</i> NCIB 8191	Phosphatidyl-Glc(α1-2)Glc(α1-3)Acyl ₂ Gro	(GroP) _n	28-35	D-Ala, Glc(α1-2)Glc	6, 10
<i>Sc. lactis</i> NCDO 712	Glc(α1-2), Acyl+6Glc(α1-3)Acyl ₂ Gro Glc(α1-2)Glc(α1-3)Acyl ₂ Gro	(GroP) _n	23	D-Ala, Gal	7
<i>Sc. lactis</i> Kiel 42172	Glc(α1-2), Acyl+6Glc(α1-3)Acyl ₂ Gro Glc(α1-2)Glc(α1-3)Acyl ₂ Gro	Gal(α1-6)Gal(α1-3)Gro(2+1αGal)-P- [-6Gal(α1-6)Gal(α1-3)Gro(2+1αGal)-P] ₆			8

Tabelle 2:

(Legende: Seite 12)

Bei einigen Gram-positiven Bakterien wurden keine Lipoteichonsäuren, sondern andere amphiphile Polymere (Lipoglycane) nachgewiesen, bei denen die "repeating units" der polymeren Kette glycosidisch und nicht über Phosphodiester verknüpft sind. Verschiedene Mikrokokken besitzen zum Beispiel ein Membran-assoziiertes Lipomannan. Es besteht aus einem Glycerinrest, der mit Fettsäuren substituiert ist und einer verzweigten Mannosekette, deren Mannoseeinheiten teilweise mit Succinat verestert sind (Powell et al., 1975). *Actinomyces viscosus* enthält ein Fettsäure-substituiertes Heteropolysaccharid (Wicken et al., 1978). Die Hauptkomponenten sind Mannose, Glucose und Galactose; Glycerinphosphat, Lysin und Alanin treten als Substituenten auf. Bei *Bifidobacterium bifidum* ssp. *pennsylvanicum* wurde ein "Lipoglucogalactan" entdeckt, das monomere Glycerinphosphat-Seitenketten trägt, die ihrerseits zum Teil mit D-Alaninresten substituiert sind (Fischer, 1987; Fischer et al. 1987). Untersuchungen, die im Rahmen einer vorhergehenden Arbeit durchgeführt wurden, ergaben, daß verschiedene andere Gram-positive Bakterien ebenfalls keine Lipoteichonsäuren, sondern Lipoglycane besitzen (Ruhland, 1984). Zudem zeigte sich, daß bei einigen Gram-positiven Bakterien amphiphile Polymere scheinbar vollständig fehlen. Um ein möglichst umfassendes Bild über die Verbreitung von Lipoteichonsäuren zu erhalten, waren jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

1.2 Funktionen und biologische Aktivitäten von Polymeren der Zelloberfläche

Die Biosynthese von sekundären Zellwandpolymeren und Lipoteichonsäuren stellt für die Mikroorganismen einen hohen Energieaufwand dar (Ward, 1981). In diesem Zusammenhang ergibt sich die Frage nach ihrer Funktion für die Zelle.

Ein wesentliches Merkmal von Teichon-, Teichuron- und Lipoteichonsäuren ist ihr polyanionischer Charakter. Es konnte gezeigt werden, daß Teichon- und Lipoteichonsäuren positiv geladene Ionen, insbesondere divalente Kationen wie Mg^{2+} , binden und dadurch möglicherweise den Kationenhaushalt der Zellen beeinflussen (Heptinstall et al., 1970; Lambert et al., 1977). Die Anwesenheit von Mg^{2+} ist zum Beispiel für die Integrität von Membranen und die Aktivität von Membranenzymen von entscheidender Bedeutung.

Autolytische Enzyme, die eine wichtige Rolle beim Wachstum und der Zellteilung spielen, interagieren sowohl mit Teichon- als auch Lipoteichonsäuren. Dies wurde zum Beispiel für *Streptococcus pneumoniae*, einem Organismus, der eine Cholin-enthaltende Teichon- sowie Lipoteichonsäure besitzt (Brundish und Baddiley, 1968; Briles und Tomasz, 1973), nachgewiesen. Während die Teichonsäure notwendig ist, damit das Enzym N-Acetylmuraminsäure-L-Alanin-Amidase in einer korrekten Orientierung an die Zellwand bindet (Garcia-Bustos und Tomasz, 1987), stellt die Lipoteichonsäure einen effektiven Inhibitor der Zellwand-lytischen Aktivität des Enzyms dar (Höltje und Tomasz, 1975). Wie für autolytische Enzyme von *S. aureus* gezeigt werden konnte, nimmt die hemmende Wirkung von Lipoteichonsäure mit einem zunehmenden Alanin-gehalt exponentiell ab (Fischer et al., 1981). Der Alanin-substitution könnte demnach eine regulatorische Rolle bei der Autolyse zukommen.

Eine mögliche Funktion von Teichonsäuren als Phosphatspeicher der bakteriellen Zellen wurde von Grant (1979) vorgeschlagen.

Eine Rolle von Lipoteichonsäure bei der Biosynthese von Teichonsäuren wird diskutiert. Fiedler und Glaser (1974a und b) konnten im Fall von *S. aureus* H nachweisen, daß Lipoteichonsäure als essentieller Akzeptor (Lipoteichonsäurecarrier) bei der "in vitro"-Synthese von Poly(Ribitphosphat) fungiert. Die Polymerisation von Ribitphosphat erfolgt dabei am terminalen Glycerinrest des Lipoteichonsäurecarriers. Spätere Untersuchungen ergaben jedoch, daß Undecaprenol-gebundene "linkage unit" ebenfalls als Akzeptor von Poly(Ribitphosphat)-Polymerase erkannt wird (Hancock et al., 1976). Eine Beteiligung von Lipoteichonsäure an der Teichonsäurebiosynthese "in vivo" wurde in Frage gestellt, nachdem gezeigt worden war, daß Alanin-substituierte Lipoteichonsäure, wie sie unter physiologischen Bedingungen vorliegt, keine Akzeptorfunktion aufweist (Fischer et al., 1980a und b). Das Vorhandensein von geringen Mengen Alaninfreier Lipoteichonsäure "in vivo" kann jedoch bisher nicht ausgeschlossen werden. McArthur et al. (1981) gelang es nachzuweisen, daß Membranpräparationen von *S. aureus* H den Transfer von an Lipoteichonsäurecarrier synthetisierten Teichonsäureketten auf Lipid-gebundene "linkage unit" katalysieren. Sie postulierten deshalb zwei mögliche Wege der Teichonsäuresynthese (Abbildung 6). Neuerdings wurde ein anderer Zusammenhang zwischen Lipoteichon- und Teichonsäure erkannt. Haas et al. (1984) zeigten, daß Alaninsubstituenten von Lipoteichonsäure in einem katalytischen Prozeß auf Teichonsäure übertragen werden.

Einige Eigenschaften von Teichon- und Lipoteichonsäuren, die wenig nützlich für die Bakterienzelle selbst sind, betreffen ihre Funktion als Phagenrezeptor (Archibald und Coapes, 1976), die Bindung von Aminoglycosidantibiotika (Kusser et al., 1985) und ihre Immunogenität.

Sowohl Teichonsäuren als auch Lipoteichonsäuren wurden als Gruppen- oder Typ-spezifische Antigene Gram-positiver Bakte-

rien erkannt (Knox und Wicken, 1973; Wicken und Knox, 1975), wobei sie von Bedeutung bei der serologischen Klassifizierung von Bakterien sein können. Einige Beispiele dafür sind in Tabelle 3 wiedergegeben.

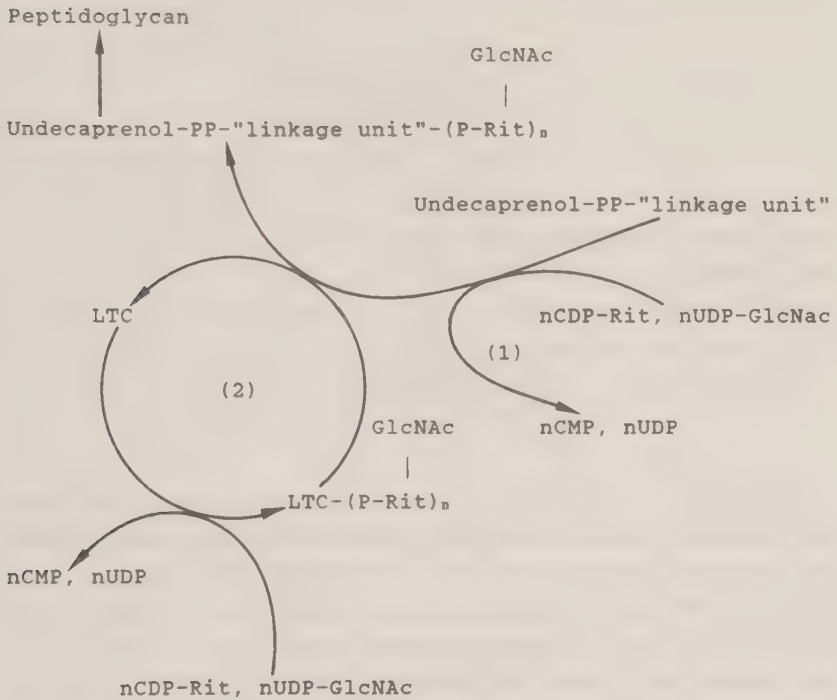


Abbildung 6:

Schematische Darstellung der Biosynthese von Teichonsäure in *S. aureus* H. Nach McArthur et al. (1981) sind zwei Biosynthesewege möglich:

- (1) Synthese der Teichonsäurekette an Lipid-gebundener "linkage unit"
- (2) Synthese der Teichonsäurekette an LTC ("Lipoteichonsäurecarrier) und anschließender Transfer auf Lipid-gebundene "linkage unit"

Tabelle 3:

Lipoteichon- und Teichonsäuren als Gruppen-spezifische Antigene bei Streptokokken und Laktobazillen.

Gattung	Gruppe	Polymer ^a	Komponenten	Ref. ^b
Streptococcus	D	LTA	Gro, Glc(α 1-2)Gro	1
	N	LTA	Gro, α -Gal	2
Lactobacillus	A	LTA	Gro, α -Glc	3
	D	TA	Rit, α -Glc	4
	F	LTA	Gro, Gal, Gal(α 1-2)Glc	5

^a LTA: Lipoteichonsäure; TA: Teichonsäure

^b Referenzen:

- (1), Toon et al., 1972; (2), Wicken und Knox, 1975;
 (3), Knox und Wicken, 1971; (4), Sharpe et al., 1964;
 (5), Knox et al., 1970

Verschiedene Funktionen und biologische Eigenschaften von Zelloberflächenkomponenten sind von entscheidender Bedeutung für die Pathogenität von Bakterien, insbesondere, da die bakterielle Zelloberfläche im Falle einer Infektion die Interaktion mit dem Wirtsorganismus vermittelt.

Bakterielle Virulenzmechanismen, an denen Zelloberflächenkomponenten beteiligt sind, betreffen (1) die Adhäsion an das Wirtsgewebe, (2) das Eindringen in das Gewebe, (3) die Aufnahme von limitierten Substraten "in vivo", (4) die Resistenz gegenüber Wirtsabwehrmechanismen und (5) die Schädigung des Wirtsorganismus (Smith, 1977).

Spezifische Adhäsionsmechanismen ermöglichen es pathogenen Bakterien mit kommensalen Keimen des Wirtes zu konkurrieren. Eine Reihe von Hinweisen sprechen für die Beteiligung von Lipoteichonsäuren bei der Anheftung von Bakterien an eukaryontische Zellen (Wicken, 1980). Ofek et al. (1982) zeigten am Beispiel von *Sc. pyogenes*, daß von der Cytoplasmamembran

losgelöste Lipoteichonsäuremoleküle über die Poly(Glycerinphosphat)-Kette mit Proteinen der bakteriellen Zelloberfläche (z. B. M-Protein) Komplexe bilden können. Dies ermöglicht eine Interaktion der freien Lipidanteile mit der Wirtszellmembran (Abbildung 7).

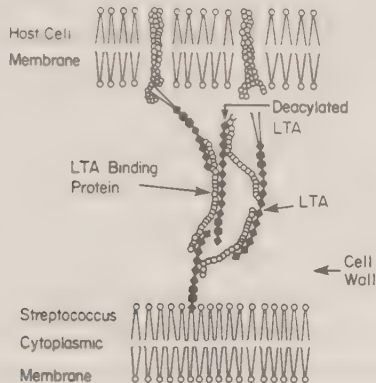


Abbildung 7:

Hypothetisches Modell der Interaktion zwischen Lipoteichonsäure und M-Protein an der Oberfläche von *Streptococcus pyogenes*-Zellen. Durch die Ausbildung von Komplexen zwischen Lipoteichonsäure, deacylierter Lipoteichonsäure und Zelloberflächen-Proteinmolekülen werden die Lipidanker der Lipoteichonsäuren so exponiert, daß sie mit Rezeptoren der Wirtszellmembran in Wechselwirkung treten können.

Bei der Adhäsion von Streptokokken der Mundflora an Hydroxylapatit, dem Hauptbestandteil des Zahnschmelzes, scheint Poly(Glycerinphosphat)-Teichonsäure beteiligt zu sein (Bolton, 1980). Ein mit der Zelloberfläche assoziiertes extrazelluläres Dextran bei *Sc. mutans* und vor allem das M-Protein bei *Sc. pyogenes* sind von Bedeutung bei verschiede-

nen anderen Adhäsionsmechanismen (Ellen und Gibbons 1972; Gibbons und van Houte, 1980).

In vielen Fällen stellen Zelloberflächenkomponenten von Bakterien Resistenzfaktoren gegen Wirtsabwehrmechanismen dar (Brubaker, 1985). Einen Schutz vor Phagocytose durch Makrophagen bieten zum Beispiel Kapselpolysaccharide, das M-Protein bei Streptokokken und Mucopptide bei Staphylokokken (Smith, 1976). Der Schutz vor Phagocytose kann dabei rein mechanischer Natur sein oder auf der Hemmung der Adsorption von Serumopsoninen beruhen. Einige pathogene Bakterien vermögen in Phagocyten zu überleben. Hierbei vermitteln möglicherweise Zelloberflächenstrukturen eine Resistenz gegenüber Bakteriozine (Smith, 1977).

Lipopolysaccharide und Lipoteichonsäuren, die nicht nur an der Zelloberfläche lokalisiert sind, sondern auch von Bakterien in das umgebende Medium abgegeben werden (Wicken und Knox, 1977), weisen einige gemeinsame biologische Eigenschaften auf, die zu einer Schwächung des Immunsystems und zur Schädigung des Wirtsorganismus bei Infektionen führen können. Eine immunsuppressive Wirkung wurde sowohl für Lipopolysaccharide als auch für Lipoteichonsäuren nachgewiesen (Schwab, 1975; Miller et al., 1976). Beide Polymere rufen eine lokalisierte und generelle Schwartzman-Reaktion in Kaninchen hervor, stimulieren die Knochenresorption bei Zahnwurzelerkrankungen und können eine Nekrose von Nierengewebe verursachen (Wicken und Knox, 1977). Lipoteichonsäuren und Lipopolysaccharide binden spontan an Erythrocyten. Antikörper gegen Lipoteichonsäuren bzw. Lipopolysaccharide können die so sensitivierten Blutzellen agglutinieren und eine Komplement-vermittelte Lyse hervorrufen (Wicken et al., 1972). Diese Eigenschaft der amphiphilen Polymere ist möglicherweise an der Zerstörung von Geweben bei Infektionen beteiligt. Toxizität und Pyrogenität, beides wichtige Faktoren in der Pathogenese, sind jedoch auf Lipopolysaccharide beschränkt (Wicken und Knox, 1980).

1.3 Einfluß von Wachstumsbedingungen auf die Zusammensetzung und Struktur der Zelloberfläche

Die chemische Zusammensetzung und Struktur der Zellhülle von Bakterien unterliegt phänotypischen Variationen, die weitgehend von Wachstumsbedingungen abhängig sind.

Wie bereits erwähnt, resultiert ein Phosphatmangel im Medium bei *B. subtilis* var. *niger* in der Synthese von Teichuronsäure an Stelle von Teichonsäure (Ellwood und Tempest, 1969 und 1972). Für eine Mutante von *S. aureus* H wurde gezeigt, daß eine Limitierung von Kalium, Stickstoff und Kohlenstoff die Ausbildung eines wesentlich geringer quervernetzten Peptidoglycans bewirkt. Darüber hinaus weist die Zellwandteichonsäure unter Phosphat- oder Stickstoffmangel eine verminderte Substitution mit D-Alanin und N-Acetylglucosamin auf (Dobson und Archibald, 1978).

Die Konzentration verschiedener Aminosäuren im Wachstumsmedium kann die Zusammensetzung des Peptidoglycans beeinflussen. Bei Wachstum von *S. aureus* mit hohen Glycinkonzentrationen können sowohl L-Alanin- als auch D-Alaninreste in den Peptiduntereinheiten des Peptidoglycans durch Glycin ersetzt werden (Hammes et al., 1973). Ein partieller Austausch von D-Alanin gegen D-Serin oder andere D-Aminosäuren ist ebenfalls möglich und resultiert in einer verminderten Quervernetzung des Mureins (Trippen et al., 1976).

Über die Zusammensetzung der Zelloberfläche von pathogenen Bakterien bei Anzucht unter "in vivo"-Bedingungen liegen bisher nur wenige Erkenntnisse vor. Untersuchungen von Mikroorganismen "in vitro" reichen jedoch nicht aus, um auf das "in vivo"-Verhalten zu schließen, da die genetische Basis der Virulenz nur bei Wachstum unter Bedingungen des Tests auf Virulenz, d. h. "in vivo", vollständig exprimiert wird (Smith, 1977).

Die Zusammensetzung und die biologischen Eigenschaften der bakteriellen Zelloberfläche bei Infektionen werden durch die Limitierung bestimmter Nährstoffe, eine langsame

Wachstumsrate, die Vermehrung in Körperflüssigkeiten oder auf Oberflächen des Wirtsorganismus und die Anwesenheit von Antibiotika in subinhibitorischen Konzentrationen entscheidend beeinflusst (Brown und Williams, 1985). Unterschiedliche Proteinprofile der Zellhülle wurden zum Beispiel für *Escherichia coli* bei Anzucht unter "in vivo"- und "in vitro"-Bedingungen nachgewiesen (Finn et al., 1982). In einigen Fällen wurden phänotypische Veränderungen der Zelloberfläche "in vivo" für eine erhöhte Resistenz gegen Abtötung durch Phagocyten verantwortlich gemacht (Smith, 1977).

Entscheidend für das langsame Wachstum von Bakterien im Fall von Infektionen sind limitierende Substrate, insbesondere Eisenmangel im Serum. "In vitro" konnte gezeigt werden, daß Bakterien unter Eisenmangel spezifische Transportsysteme mit hoher Affinität für Eisen synthetisieren (Neilands, 1982). Veränderte Wachstumsbedingungen können auch das Adhäsionsverhalten und die Immunogenität der Zelloberfläche von Bakterien beeinflussen (Brown und Williams, 1985). Antibiotika, mit denen Bakterien "in vivo" oftmals konfrontiert werden, bewirken ebenfalls Veränderungen in der Zellhülle. In Gegenwart von Penicillin, in subinhibitorischen Konzentrationen, konnten Staphylokokken keine vollständige Zellteilung mehr durchführen und bildeten multiple Zellen mit ungewöhnlich dicken Querwänden aus (Lorian et al., 1982).

1.4 Die Gattungen *Listeria* und *Staphylococcus*

Wie anhand einiger Beispiele aufgezeigt wurde, ist eine genaue Kenntnis der Zusammensetzung und Biochemie bakterieller Zelloberflächen, die in vielerlei Hinsicht in Virulenzmechanismen involviert sein können, notwendig, um die Pathogenität der Mikroorganismen zu verstehen. Im Mittelpunkt vorliegender Arbeit standen deshalb Untersuchungen an der Zelloberfläche pathogener und nicht-pathogener Bakterienstämme der Gattungen *Listeria* und *Staphylococcus*.

In der achten Ausgabe von "Bergey's Manual" wurden unter der Gattung *Listeria* vier Spezies, *L. monocytogenes*, *L. grayi*, *L. murrayi* und *L. denitrificans* aufgeführt, die als Gram-positive, nicht-sporulierende, fakultativ anaerobe, bewegliche und morphologisch variable Stäbchen charakterisiert sind (Seeliger und Welshimer, 1974). Listerien sind entgegen früherer Anschauungen in der Natur weit verbreitet und werden im Boden, auf Pflanzenmaterial, im Abwasser, in Lebensmitteln (Milch, Käse u. a.) und im Stuhl von Menschen und Tieren regelmäßig nachgewiesen.

Pathogene Stämme von *L. monocytogenes* verursachen als fakultativ intrazelluläre Parasiten beim Menschen und zahlreichen Tierarten eine ernsthafte Infektionskrankheit, die Listeriose. Der Speziesname "monocytogenes" bezeichnet die Eigenschaft des Bakteriums in infizierten Kaninchen, nicht jedoch beim Menschen, eine Monocytose, d. h. die Produktion einer großen Anzahl von Monocyten, hervorzurufen (Murray et al., 1926). Von entscheidender Bedeutung für die Virulenz ist die Fähigkeit von *L. monocytogenes*, in nicht-aktivierten Monocyten zu überleben und sich zu vermehren (Mackaness, 1962).

Listeriose-Fälle beim Menschen traten in jüngster Zeit mit zunehmender Häufigkeit in Europa vor allem in der Schweiz, Frankreich und auch in der Bundesrepublik Deutschland auf. Eine Infektion erfolgt oftmals durch den Genuß von Nahrungs-

mitteln (z. B. Milch oder Milchprodukte und Wurst). Zu dem Personenkreis, der von der Krankheit am meisten betroffen ist, zählen Neugeborene, ältere Menschen, Alkoholiker, Immunabwehr-geschwächte Personen und schwangere Frauen. Die drei häufigsten Formen der Listeriose sind: (1) Meningoenzephalitis, (2) Septikämie und (3) intrauterine Infektion des Fötus, die zu einer Früh- bzw. Totgeburt oder einer Erkrankung des Neugeborenen führt (Seeliger, 1961; Gray und Killinger, 1966; Relier, 1979).

Die taxonomische Stellung der apathogenen Arten *L. grayi* und *L. murrayi* in der Gattung *Listeria* war lange Zeit unklar. Stuart und Welshimer (1974) schlugen aufgrund von DNS/DNS-Hybridisierungsstudien vor, diese beiden Spezies in einer neuen Gattung "Murraya" zusammenzufassen. Andererseits sprachen sich Wilkinson und Jones (1977), Fiedler und Seger (1983) sowie Fiedler et al. (1984) auf der Basis biochemischer Daten für den Verbleib der beiden Spezies in der Gattung *Listeria* aus. Durch 16S rRNA-Oligonucleotid-Sequenzanalysen wurde die Zugehörigkeit dieser Arten zur Gattung *Listeria* bestätigt (Rocourt et al., 1987a).

Die Spezies *L. denitrificans* wurde aufgrund der vergleichenden Sequenzanalyse der 16S rRNA aus der Gattung *Listeria* ausgeschlossen und als *Jonesia denitrificans* einer neuen Gattung *Jonesia* zugeordnet (Rocourt et al., 1987b). Die taxonomische Neueinordnung dieser Spezies unterstützen auch Ergebnisse von Untersuchungen zur Morphologie, Biochemie und Serologie sowie Nucleinsäurestudien (Stuart und Welshimer, 1973; Wilkinson und Jones, 1977; Fiedler und Seger, 1983; Jones, 1975).

Umfangreiche DNS/DNS-Hybridisierungsuntersuchungen an *L. monocytogenes*-Stämmen führten zu einer Aufspaltung dieser Species in fünf Genomgruppen (Rocourt et al., 1982), die dem Typstamm *L. monocytogenes* und vier neuen Spezies *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* und *L. welshimeri* zugeordnet wurden (Seeliger, 1981; Seeliger et al., 1984; Rocourt und Grimont, 1983).

Die insgesamt sieben Arten der Gattung *Listeria* können aufgrund verschiedener Merkmale differenziert werden (Tabelle 4).

Tabelle 4:

Merkmale zur Differenzierung der verschiedenen Spezies der Gattung *Listeria* (Seeliger und Jones, 1986).

Merkmal	L.m.	L.i.	L.s.	L.w.	L.iv.	L.g.	L.mu. ^a
β -Hämolysse	+ ^b	-	+	-	+	-	-
CAMP-Test							
(S. aureus)	+ ^b	-	+	-	-	-	-
CAMP-Test							
(R. equi) ^c	-	-	-	-	+	-	-
Säureprod. aus:							
Mannit	-	-	-	-	-	+	+
D-Xylose	-	-	+	+	+	-	-
NO ₃ -Reduktion	-	-	-	-	-	-	+
Pathogenität							
für Mäuse	+ ^b	-	-	-	+	-	-

^a Abkürzungen: L.m.: *L. monocytogenes*; L.i.: *L. innocua*; L.s.: *L. seeligeri*; L.w.: *L. welshimeri*; L.iv.: *L. ivanovii*; L.g.: *L. grayi*; L.mu.: *L. murrayi*

^b Keine positive Reaktion beim Typstamm *L. monocytogenes* ATCC 15313

^c *Rhodococcus equi*

L. monocytogenes enthält human- und tierpathogene Stämme, die mit Ausnahme des Typstammes ATCC 15313 auf Blutagar eine β -Hämolysse hervorrufen und im CAMP-Test mit *S. aureus* positiv reagieren. *L. ivanovii* umfaßt tierpathogene Stämme, die β -hämolytisch sind und im CAMP-Test mit *Rhodococcus equi*

eine positive Reaktion zeigen. Stämme der Spezies *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* und *L. murrayi* sind avirulent.

Mit Ausnahme von *L. seeligeri* ist die β -hämolytische Aktivität eine Eigenschaft, die nur pathogenen *Listeria*-Stämmen zu eigen ist. Hervorgerufen wird die β -Hämolyse durch ein extrazelluläres Hämolysin (Listeriolysin), das im Fall von *L. monocytogenes* eingehend charakterisiert wurde. Es handelt sich dabei um ein Thiolgruppen-aktiviertes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 60.000 D (Geoffroy et al., 1987).

Durch Transposonmutagenese konnte gezeigt werden, daß mit dem Verlust der hämolytischen Aktivität ein Verlust der Virulenz einhergeht (Gaillard et al., 1986; Kathariou et al., 1987). Das Toxin stellt demnach einen entscheidenden Faktor bei der Pathogenese von Listerien dar. Es bewirkt kardiotoxische und letale Effekte in Mäusen (Kingdon und Sword, 1970a), sowie eine Zerstörung von phagocytierenden Zellen und Lysosomen (Kingdon und Sword, 1970b). Eine wichtige Rolle spielt das Listeriolysin vermutlich bei der intrazellulären Vermehrung von *L. monocytogenes* in Makrophagen (Geoffroy et al., 1987).

Einige biologische Eigenschaften, die möglicherweise die Virulenz und Immunabwehr bei *Listeria*-Infektionen beeinflussen, werden Zelloberflächenkomponenten zugeschrieben.

Phenolextrakte von verschiedenen pathogenen *Listeria*-Stämmen weisen biologische Aktivitäten auf, die für Endotoxine Gram-negativer Bakterien typisch sind (Wexler und Oppenheim, 1979; Singh et al., 1981). Das Vorkommen eines "Listeria-Lipopolysaccharids" bei *L. monocytogenes*, wie von Wexler und Oppenheim (1980) vorgeschlagen wurde, ist jedoch umstritten (Hether und Jackson, 1983). Rohzellwandpräparate von virulenten *Listeria*-Stämmen wirken als Adjuvans (Campbell et al., 1975), stimulieren die Aktivität von Makrophagen (Campbell et al., 1979) und induzieren eine erhöhte Resistenz gegenüber *Listeria*-Infektionen (Rodriguez et al., 1974). Hether et al. (1983) zeigten, daß diese

immunmodulierenden Eigenschaften von Zellwandfraktionen unterschiedlicher Zusammensetzung hervorgerufen werden. Antonissen et al. (1986) reinigten ein Protein aus Zellhüllfragmenten von *L. monocytogenes*, das eine Allergie vom verzögerten Typ hervorruft. Kapseln, die oftmals wichtige Virulenzfaktoren bei Bakterien darstellen, konnten für *L. monocytogenes* nicht nachgewiesen werden (Seeliger und Bockemühl, 1968).

Die Entstehung der spezifischen Immunantwort gegen fakultativ intrazelluläre Bakterien wurde am Beispiel von *L. monocytogenes* eingehend studiert. Untersuchungen an Mäusen ergaben, daß die erworbene Immunität gegenüber Listerien durch T-Zellen vermittelt wird (Mackaness, 1962; Lane und Unanue, 1972). Eine starke Immunantwort kommt nur dann zustande, wenn die Mäuse mit lebenden Zellen von virulenten *Listeria*-Stämmen immunisiert werden (Kaufmann, 1984). Untersuchungen von Berche et al. (1987) weisen darauf hin, daß vermutlich ein intrazelluläres Wachstum von *L. monocytogenes* in Makrophagen notwendig ist, um die T-Zell-vermittelte Immunantwort auszulösen.

Die humorale Immunantwort spielt vermutlich nur eine untergeordnete Rolle. Antikörper sind jedoch von großer Bedeutung für die serologische Klassifizierung von Listerien und werden in der Diagnose und für epidemiologische Untersuchungen angewendet (Seeliger und Höhne, 1979). Aufgrund der serologischen Analyse von O- und H-Antigenen zahlreicher *Listeria*-Stämme wurde das ursprünglich vier Serotypen umfassende Antigenschema nach Paterson (1940) durch Seeliger und Donker-Voet neu definiert und erweitert (Donker-Voet, 1972; Seeliger 1975 und 1976). Danach können in der Gattung *Listeria*, ausgenommen die Spezies *L. murrayi* und *L. grayi*, 16 verschiedene Serovarietäten auf der Basis der Agglutination ganzer Zellen mit Faktorensereen unterschieden werden (Tabelle 5).

Tabelle 5:

Serovarietäten in der Gattung *Listeria* nach Seeliger und Donker-Voet.

Stamm ^a	Serovar	O-Antigene	H-Antigene
L. m. ^b	1/2a	I, II, (III) ^d	A, B
	1/2b	I, II, (III)	A, B, C
	1/2c	I, II, (III)	B, D
	3a	II, (III), IV	A, B
	3b	II, (III), IV, (XII, XIII)	A, B, C
	3c	II, (III), IV, (XII, XIII)	B, D
	4a	(III), (V), VII, IX	A, B, C
	4ab	(III), V, VI, VII, IX, X	A, B, C
	4b	(III), V, VI	A, B, C
	4c	(III), V, VII	A, B, C
	4d	(III), (V), VI, VIII	A, B, C
	4e	(III), V, VI, (VIII), (IX)	A, B, C
	7	(III), XII, XIII	A, B, C
L. iv.	5	(III), (V), VI, (VIII), X	A, B, C
L. i. ^c	6a	(III), V, (VI), (VII), (IX), XV	A, B, C
	6b	(III), (V), (VI), (VII), IX, X, XI	A, B, C
L. g.		(III), XII, XIV	E
L. mu.		(III), XII, XIV	E

^a L. m.: *L. monocytogenes*; L. iv.: *L. ivanovii*; L. i.: *L. innocua*; L. g.: *L. grayi*; L. mu.: *L. murrayi*

^b Stämme von *L. seeligeri* können serologisch nicht von *L. monocytogenes* unterschieden werden.

^c Stämme von *L. welshimeri* können serologisch nicht von *L. innocua* unterschieden werden.

^d Die in Klammern gesetzten Antigene sind nicht immer vorhanden.

Faktorseren, die gegen O- oder H-Antigene gerichtet sind, werden durch Absorption von Vollseren gegen bestimmte *Listeria*-Stämme mit Zellen heterologer Stämme erhalten (Seeliger und Höhne, 1979). Wie aus Tabelle 5 ersichtlich ist, können die pathogenen *L. monocytogenes*-Stämme zwar nicht von *L. seeligeri*, aber von allen anderen *Listeria*-Spezies serologisch unterschieden werden. Probleme in der Diagnose ergeben sich aufgrund von Kreuzreaktionen von Anti-*Listeria*-Seren mit anderen Gram-positiven Bakterien, wie zum Beispiel Staphylokokken und Streptokokken (Gray und Killinger, 1966). In diesem Zusammenhang war und ist es von großer Wichtigkeit, Listerien- und Serovarietäten-spezifische Zelloberflächenkomponenten als potentielle Antigene zu identifizieren und biochemisch zu definieren.

Ullmann und Cameron (1969) extrahierten immunologisch aktive Kohlenhydrate aus Zellwänden verschiedener *Listeria*-Serovarietäten. Unterschiedliche Zuckerkomponenten wurden dabei als antigene Determinanten nachgewiesen. Eine Poly(Ribitphosphat)-Teichonsäure, die mit Rhamnose und N-Acetylglucosamin substituiert ist, wurde als Antigen bei *L. monocytogenes* Stamm EGD identifiziert (Kamisango et al., 1983).

Fiedler und Seger (1983) sowie Fiedler et al. (1984) untersuchten die Zellwandzusammensetzung von 37 *Listeria*-Stämmen, die sämtliche Arten und Serovarietäten der Gattung *Listeria* repräsentieren. Danach besitzen alle Stämme ein direkt quervernetztes Peptidoglycan vom Typ A1 α (Schleifer und Kandler, 1972) mit meso-Diaminopimelinsäure an Position 3 der Peptiduntereinheiten (Abbildung 2). *Jonesia denitrificans* (früher *L. denitrificans*) hingegen zeichnet sich durch einen anderen Mureintyp (A4 α) aus. Dies unterstützt die kürzlich auf der Basis von 16S rRNA-Sequenzanalysen vorgenommene Neuklassifizierung dieser Spezies (Rocourt et al., 1987b).

Teichonsäuren kommen bei allen Arten und Serovarietäten der Gattung *Listeria* vor. Sie enthalten Ribit, Phosphat und verschiedene Zucker- bzw. Aminosuckerkomponenten.

Nach Fiedler et al. (1984) können *Listeria*-Stämme aufgrund

einer unterschiedlichen glycosidischen Substitution ihrer Teichonsäuren in sechs Gruppen eingeteilt werden, die auffällig mit den Serovarietäten korrelieren (Tabelle 6).

Tabelle 6:

Einteilung der Gattung *Listeria* in Teichonsäuregruppen nach Fiedler et al. (1984).

Teichonsäure- gruppe	<i>Listeria</i> - Serovarietät	Zuckerkomponenten
I	1/2a, 1/2b, 1/2c	Rha, GlcNAc
II	3a, 3b, 3c	GlcNAc
III	4a, 4c, 4e, 6a	GlcNAc, Gal
IV	4b	GlcNAc, Gal, Glc
V	4ab, 6b, 4d, 5	GlcNAc, Glc
VI	7, <i>L. murrayi</i> , <i>L. grayi</i>	---

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß Teichonsäuren möglicherweise die biochemische Grundlage für die Einteilung der Gattung *Listeria* in Serovarietäten darstellen. Um diese Hypothese zu untermauern, waren jedoch detailliertere Untersuchungen zur Struktur und Immunogenität der Teichonsäuren von verschiedenen *Listeria*-Serovarietäten notwendig.

Hether und Jackson (1983) isolierten eine Lipoteichonsäure aus *L. monocytogenes* (Serotyp 1), deren hydrophiler Anteil aus einer Poly(Glycerinphosphat)-Kette besteht, wobei die Glycerinreste über Phosphodiester 1,3-verknüpft sind. Den hydrophoben Anteil bildet ein Glycolipid, das Galactose und Glucose enthält. Ein Galactose-enthaltendes Disaccharid wurde als Substituent der Poly(Glycerinphosphat)-Kette postuliert. In einer vorhergehenden Arbeit wurden neben *L. monocytogenes* SV 1/2a die Spezies *L. grayi*, *L. murrayi* und *Jonesia denitrificans* auf das Vorkommen von

Lipoteichonsäuren untersucht (Ruhland, 1984). Alle Stämme, mit Ausnahme von *Jonesia denitrificans*, enthalten Lipoteichonsäuren des Poly(Glycerinphosphat)-Typs. Die Glycerinreste der hydrophilen Ketten sind zum Teil mit D-Alanin substituiert. Im Fall von *L. monocytogenes* tritt α -glycosidisch gebundene Galactose als zusätzlicher Substituent auf. Um eine mögliche Rolle von Lipoteichonsäuren bei der serologischen Klassifizierung von *Listeria*-Serovarietäten zu klären, sollten weitere Untersuchungen bei Vertretern aller Arten und verschiedenen Serovarietäten der Gattung *Listeria* durchgeführt werden.

Die Gattung *Staphylococcus* umfaßt 19 Spezies, bei denen es sich um Gram-positive, mit Ausnahme von *S. saccharolyticus* (anaerob), fakultativ anaerobe Kokken handelt (Kloos und Schleifer, 1986). Der G+C-Gehalt der DNA liegt im Bereich von 30-39 Mol%. Auf der Basis von DNA/DNA-Hybridisierungen und phänotypischen Merkmalen kann die Gattung *Staphylococcus* in vier "Spezies-Gruppen" eingeteilt werden (Schleifer et al., 1979; Kloos, 1980; Kloos und Schleifer, 1981). Die *S. epidermidis*-Gruppe setzt sich aus den Spezies *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* und *S. saccharolyticus* zusammen. Der *S. saprophyticus*-Gruppe gehören die Spezies *S. saprophyticus*, *S. cohnii* und *S. xylosus* an. Die *S. simulans*-Gruppe enthält die Spezies *S. simulans* und *S. carnosus*. Die *S. sciuri*-Gruppe bilden die Spezies *S. sciuri* und *S. lentus*. Die Arten *S. aureus*, *S. auricularis*, *S. intermedius*, *S. hyicus* und *S. caseolyticus* lassen sich aufgrund ihrer zu entfernten Verwandtschaft nicht in einer weiteren "Spezies-Gruppe" zusammenfassen. Ebenso wie Listerien sind auch Staphylokokken in der Natur weit verbreitet. Sie sind zum Beispiel auf der Haut von Warmblütern, in tierischen Lebensmitteln (Wurst, Milch, Käse u. a.), im Boden, in der Luft und im Wasser zu finden. Einige Spezies (*S. aureus*, *S. epidermidis* und *S. saprophy-*

ticus) sind opportunistisch pathogen für den Menschen und/oder Tiere. *S. aureus* verursacht beim Menschen eine Reihe von ernsthaften Infekten, unter anderem Abszesse, Osteomyelitis, Endokarditis und Lungenentzündung. Viele Stämme bilden Enterotoxine, die Nahrungsmittelvergiftungen hervorrufen können. *S. aureus*-Stämme unterscheiden sich von allen übrigen Staphylokokken, mit Ausnahme von *S. intermedius*, durch die Produktion von Koagulase, die in einer freien und einer Zell-gebundenen Form ("clumping factor") vorliegen kann. Fast alle Stämme von *S. aureus* produzieren außerdem ein oder mehrere verschiedene Hämolsine sowie Nucleasen. Eine charakteristische Zellwandkomponente von *S. aureus* ist, wie bereits erwähnt, das Protein A, das kovalent mit dem Murein verknüpft ist.

Alle Staphylokokken besitzen ein Peptidoglycan des Typs A3 α (Schleifer und Kandler, 1972), wobei benachbarte Glycanstränge über eine Interpeptidbrücke zwischen L-Lysin an Position 3 und D-Alanin an Position 4 der Peptiduntereinheiten verknüpft sind (Abbildung 3). Die Interpeptidbrücken werden in der Regel von fünf bis sechs Glycinresten (z. B. *S. aureus* und *S. xylosus*), vier Glycin- und einem L-Serinrest (z. B. *S. epidermidis*) oder vier Glycin- und einem L-Alaninrest (z. B. *S. sciuri*) gebildet (Schleifer, 1983). Wie bereits erwähnt unterliegt jedoch die chemische Zusammensetzung des Peptidoglycans phänotypischen Variationen in Abhängigkeit von den Anzuchtbedingungen.

Teichonsäuren kommen bei allen bisher bekannten Arten der Gattung *Staphylococcus* vor. Es wurden jedoch verschiedene Strukturtypen nachgewiesen (Tabelle 1). *S. aureus*-Stämme besitzen, von einigen Ausnahmen abgesehen, Teichonsäuren vom Poly(Ribitphosphat)-Typ, an denen α - und β -N-Acetylglucosaminylreste substituieren (Baddiley et al., 1961 und 1962; Sanderson et al., 1962). Zellwände von *S. epidermidis* Stamm 1254 und I2 enthalten dagegen Poly(Glycerinphosphat)-Teichonsäuren, die α - oder β -Glucosylsubstituenten tragen (Oeding et al., 1967; Davison and Baddiley, 1964). In

S. xylosus kommen nebeneinander eine Poly(Glycerinphosphat)- und Poly(Ribitphosphat)-Teichonsäure vor, wobei Polyolreste mit α - bzw. β -glycosidisch gebundenem N-Acetylglucosamin substituiert sein können (Fiedler und Steber, 1984; Endl et al., 1983). Teichonsäuren der Struktur Poly(-GlcNAc-1-P-Gro-P-) sind bei *S. sciuri* und *S. hyicus* ssp. *hyicus* vorhanden (Endl et al., 1983). Eine Poly(-6-GlcNAc-1-P)-Teichonsäure wurde bei *S. auricularis* nachgewiesen (Endl et al., 1983). Im Gegensatz zu den Teichonsäuren ist über die Verbreitung von Lipoteichonsäuren innerhalb der Gattung *Staphylococcus* bisher nur wenig bekannt. Neben *S. aureus* H wurden nur die Stämme *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. carnosus* und *S. saccharolyticus* auf das Vorkommen von Lipoteichonsäuren untersucht (Ruhland, 1984). Bei diesen Organismen konnten Lipoteichonsäuren nachgewiesen werden, die eine identische Struktur aufweisen, wie sie für *S. aureus* H in Abbildung 5 wiedergegeben ist. Um die Kohärenz der Gattung *Staphylococcus* am Beispiel von Lipoteichonsäuren zu überprüfen, waren weitere Untersuchungen über das Vorhandensein und die Struktur dieser amphiphilen Polymere notwendig.

1.5 Untersuchungsziele dieser Arbeit

Die vorliegender Arbeit zugrunde gelegten Aufgabenstellungen und Untersuchungsziele können wie folgt zusammengefaßt werden:

- (1) Es sollte ein Beitrag zur biochemischen und immunologischen Charakterisierung der Zelloberfläche von Listerien geleistet werden, um möglicherweise Serovarietäten-spezifische Antigene zu identifizieren. Im Mittelpunkt der Arbeit standen dabei Lipoteichonsäuren, Teichonsäuren und Proteinantigene.
- (2) Ein weiteres Ziel war, das Vorkommen und die Struktur von Lipoteichonsäuren bei den Gattungen *Listeria* und *Staphylococcus* sowie Vertretern verschiedener anderer taxonomischer Gruppen Gram-positiver Bakterien zu untersuchen, um Aussagen zur Verbreitung und taxonomischen Relevanz dieser amphiphilen Polymere zu ermöglichen.
- (3) Der Einfluß von Wachstumsbedingungen auf die Zusammensetzung und Struktur der Zelloberfläche von Bakterien sollte am Beispiel von Listerien bei Anzucht unter Phosphatmangelbedingungen und im Fall von Staphylokokken bei Wachstum unter angenäherten "in vivo"-Verhältnissen untersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme der Gattung *Listeria* und ihre Herkunft sind in Tabelle 7, Bakterienstämme anderer Gattungen in Tabelle 8 aufgeführt.

Erläuterungen zu Bezugsquellen:

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA

DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Braunschweig

NCDO: National Collection of Dairy Organisms, Reading,
England

NCTC: National Collection of Type Cultures, London, England

SLCC: Special *Listeria* Culture Collection, Würzburg

CIP: Collection Institut Pasteur, Paris, Frankreich

Tabelle 7:

Verwendete Bakterienstämme der Gattung *Listeria* und ihre Herkunft.

Die Stämme wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. H. P. R. Seeliger (Würzburg) zur Verfügung gestellt.

Stamm	Sero- varietät	Stammnummer			
		SLCC	NCTC	ATCC	CIP
<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	5850	10357	15313 ^r	
<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	2371	7973	19111	7831
<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	5782 ^a			
<i>L. monocytogenes</i>	3a	2373	5105	19113	7834
<i>L. monocytogenes</i>	4b	2375	10527	19115	7838
<i>L. monocytogenes</i>	4b	5778 ^b			

(Fortsetzung: Seite 36)

<i>L. monocytogenes</i>	7	2482			7843
<i>L. ivanovii</i>	5	2379 [†]		19119	7842
<i>L. innocua</i>	6a	3379 [†]	11288	33090	8011
<i>L. innocua</i>	6b	3423 [†]	11289	33091	8012
<i>L. seeligeri</i>	1/2b	3954 [†]			100100
<i>L. welshimeri</i>	6a	5334 [†]			8149
<i>L. murrayi</i>				25401 [†]	
<i>L. grayi</i>				19120 [†]	

^aStamm von Prof. Dr. Potel, Hannover (R-Form, Abstammung von SV 1/2a, orig. Nr. 32/46J)

^bStamm von Prof. Dr. Potel, Hannover (R-Form, Abstammung von SV 4b, orig. Nr. 1345)

[†]Typstamm

Tabelle 8:

Verwendete Bakterienstämme verschiedener Gattungen und ihre Herkunft.

Stamm	Herkunft	Stammnummer
<i>S. aureus</i> H	^a	
<i>S. aureus</i>	DSM	20231
<i>S. aureus</i>	DSM	20232
<i>S. aureus</i>	DSM	20491
<i>S. capitis</i>	DSM	20326
<i>S. cohnii</i>	DSM	20260
<i>S. epidermidis</i>	DSM	20044
<i>S. hominis</i>	DSM	20328
<i>S. saprophyticus</i>	DSM	20229
<i>S. sciuri</i>	DSM	20352
<i>S. simulans</i>	DSM	20322

(Fortsetzung: Seite 37)

<i>S. warneri</i>	DSM	20316
<i>S. xylosus</i>	DSM	20266
<i>Aerococcus viridans</i>	DSM	20311
<i>Bacillus acidocaldarius</i>	DSM	446
<i>Bacillus cereus</i>	DSM	31
<i>Bacillus macerans</i>	DSM	24
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	DSM	20171
<i>Deinococcus radiodurans</i>	DSM	20539
<i>Jonesia denitrificans</i>	ATCC	14870
<i>Mycobacterium phlei</i>	DSM	43214
<i>Oerskovia turbata</i>	DSM	20577
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC	27853
<i>Salmonella minnesota</i> SF III	^b	
<i>Streptococcus lactis</i>	NCDO	712
<i>Streptomyces griseus</i>	DSM	40236

^a Laborstammsammlung

^b Der Stamm *Salmonella minnesota* SF III wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. E. Rietschel (Borstel) zur Verfügung gestellt.

2.2 Nährmedien und Anzuchtbedingungen

Folgende Medien wurden für die Anzucht der verschiedenen Organismen gewählt:

Hefe-Dextrose-Medium (HD):

5,0 g Glucose, 5,0 g Hefeextrakt, 10,0 g Pepton aus Casein und 5,0 g NaCl ad 1 l H₂O deion.

pH 7,5

Brain Heart Infusion-Medium (BHI):

37 g BHI (Fa. Merck od. Fa. Oxoid) ad 1 l H₂O deion.

Nutrient-Medium:

(Medium NR.1, DSM-Katalog, 1983)

5,0 g Pepton und 3,0 g Fleischextrakt ad 1 l H₂O deion.

pH 7,0

Bacillus acidocaldarius-Medium:

(Medium NR.13, DSM-Katalog, 1983)

Lösung A:

1,0 g Hefeextrakt

0,2 g (NH₄)₂SO₄

0,5 g MgSO₄ x 7H₂O

0,25 g CaCl₂ x 2H₂O

0,6 g KH₂PO₄

ad 500 ml H₂O deion.

pH 3,0-4,0

Lösung B:

1,0 g Glucose

ad 500 ml H₂O deion.

Lösung A und B wurden getrennt autoklaviert und nach dem Abkühlen vereinigt.

Aerococcus viridans-Medium:

10,0 g Glucose, 10,0 g Pepton, 10,0 g Hefeextrakt und 5,0 g K₂HPO₄ ad 1 l H₂O deion.

pH 7,2

Mycobacterium Intracellulare-Medium:

(Medium NR.126, DSM-Katalog, 1983)

5,0 g Pepton, 3,0 g Fleischextrakt und 20,0 g Glycerin ad 1 l H₂O deion.

pH 7,0

Human-Blutplasma:

Antibiotika-freies Human-Blutplasma, das zur Anzucht verschiedener *Staphylococcus*-Stämme unter angenäherten "in vivo"-Bedingungen verwendet wurde, stammte von der Städtischen Gesundheitsbehörde (München).

Synthetisches Medium (MOPS_{suppl.}-Medium):

Dem Minimalmedium (MOPS-Medium) nach Neidhardt et al. (1974) wurden Aminosäuren, Nucleoside und Vitamine zugesetzt.

MOPS-Medium: 40 mM N-Morpholinopropansulfonsäure

4 mM Tricin, pH 7,5

0,01 mM FeSO₄

9,75 mM NH₄Cl

5 x 10⁻³ mM CaCl₂

0,176 mM MgCl₂

50 mM NaCl

0,276 mM K₂SO₄

1,0-5,0 mM K₂HPO₄ (a. St. v. 1,32 mM)

2 % Glucose (a. St. v. 0,4 %)

Pro 1 l Medium wurde 1 ml einer Spurenelementlösung beigelegt:

3 x 10⁻³ mM (NH₄)₆Mo₇O₂₄

0,4 mM H₃BO₃

3 x 10⁻² mM CoCl₂

1 x 10⁻² mM CuSO₄

8 x 10⁻² mM MnCl₂

1 x 10⁻² mM ZnSO₄

Supplemente: Aminosäuren: 100 µg/ml (Zugabe der 20 natürlichen Aminosäuren der Proteine)

Nucleoside: 40 µg/ml (Adenosin, Guanosin, Cytidin, Thymidin und Uridin)

Vitamine: 2 mg/l Biotin, 2 mg/l Folsäure, 10 mg/l Pyridoxin/HCl, 5 mg/l Riboflavin, 5 mg/l Thiamin, 5 mg/l Pantothersäure, 0,1 mg/l Vit. B₁₂, 0,1 mg/l p-Aminobenzoessäure, 5 mg/l Liponsäure

Zur Herstellung von festen Nährböden wurden 12 g Agar (Fa. Oxoid) pro 1 l Medium zugesetzt.

Die Anzucht der Stämme in Flüssigmedium erfolgte in 5 l

Erlenmeyerkolben (1,5 l Medium) oder in 20 l Steilbrustflaschen (15 l Medium). Die Kulturen (aerob) wurden durch Schütteln oder über eine Filterkerze steril mit Pressluft belüftet. Die Reinheitskontrolle der Kulturen erfolgte durch Phasenkontrastmikroskopie und Verdünnungsausstriche auf mit Agar verfestigtem Anzuchtmedium.

Das Wachstum der Organismen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 578 nm (OD_{578nm}) verfolgt.

Die Kultivierungsbedingungen für die untersuchten Bakterienstämme sind in Tabelle 9 zusammengefaßt.

Tabelle 9:

Kultivierungsbedingungen für die untersuchten Organismen.

Organismus	Medium	Temp. ^a
<i>Aerococcus viridans</i>	Aerococcus-Medium	37 °C
<i>B. acidocaldarius</i>	<i>B. acidocald.</i> -Medium	60 °C
<i>B. cereus</i>	Nutrient-Medium	30 °C
<i>B. macerans</i>	Nutrient-Medium	30 °C
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	HD	26 °C
<i>Deinococcus radiodurans</i>	HD	26 °C
Listerien ^b	BHI	37 °C
<i>Mycobacterium phlei</i>	<i>Mycobact.</i> -Medium	37 °C
<i>Oerskovia turbata</i>	HD	26 °C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	HD	37 °C
<i>Salmonella minnesota</i> SF III	HD	37 °C
Staphylokokken	HD	37 °C

^a Anzuchttemperatur

^b Die Stämme *L. ivanovii* ATCC 19119 und *L. seeligeri* SLCC 3954 zeigten nur auf BHI der Firma Oxoid gutes Wachstum.

2.3 Zellernte

Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation bei 14.000 x g für 20 min bei 4 °C. Anschließend wurden die Zellen mit physiologischer Kochsalzlösung oder einem für die weitere Präparation verwendeten Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert.

Kulturen von Listerien wurden vor der Ernte für 15 min auf 100 °C erhitzt oder für 2 h bei RT mit Formaldehyd (1 %, v/v) inkubiert, um die Zellen abzutöten.

2.4 Aufschluß der Zellen

Ein Teil feuchter Zellen wurde mit zwei Teilen Glasperlen (0,3 mm Durchmesser, Fa. Braun) zu einem relativ dicken Brei vermengt. Der Aufschluß der Zellen erfolgte in einer Zelmühle (Fa. Bühler) für ca. 10-15 min unter Wasserkühlung. Nach einer mikroskopischen Kontrolle wurde das Homogenat aufgebrochener Zellen von den Glasperlen mittels einer Fritte (Porosität 1, Fa. Schott) abgetrennt.

2.5 Präparation von Zellwänden und Zellmembranen

2.5.1 Tryptisch verdaute Zellwände

Rohzellwände wurden durch Sedimentation (48.000 x g, 30 min) aus dem Zellhomogenat aufgebrochener Zellen (2.4) gewonnen (Schleifer und Kandler, 1967). Die sedimentierten Zellwände wurden in 0,01 M Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) suspendiert und zur Inaktivierung autolytischer Enzyme für 10 min bei 100 °C gekocht. Nach dem Abkühlen folgte eine Trypsinbehandlung (0,5 mg Trypsin/ml) durch Inkubation bei 37 °C für 16 h unter Toluolatmosphäre. Die tryptisch behandelten Zellwände wurden bei 48.000 x g (20 min) sedimentiert, fünfmal mit H₂O bidest. gewaschen und anschließend gefriergetrocknet.

2.5.2 Natriumdodecylsulfat (SDS)-Behandlung von Zellwänden

In eine siedende 8%ige SDS-Lösung (w/v) wurde unter Rühren ein gleiches Volumen einer wässrigen Zellwandsuspension (4mg Rohzellwand/ml) tropfenweise zugegeben. Diese Suspension wurde anschließend für 30 min bei 100 °C gerührt. Nach dem Abkühlen wurden die Zellwände sedimentiert (48.000 x g, 20 min) und zur Entfernung von SDS fünfmal mit H₂O bidest. gewaschen.

2.5.3 Zellmembranen

Aus den Homogenaten aufgebrochener Zellen wurden zunächst die Rohzellwände durch Sedimentation entfernt (2.5.1). Anschließend erfolgte die Präparation von Zellmembranen durch Ultrazentrifugation der erhaltenen Überstände für 1 h bei 100.000 x g und 4 °C.

2.6 Präparation von Teichonsäuren

Trypsin-behandelte Zellwände (100 mg) wurden mit 20 ml Glycin/HCl (0,025 M, pH 2,5) bei 100 °C für 10 min extrahiert und bei 48.000 x g (20 min) sedimentiert (Kaya et al., 1985a). Nach Abnahme des Überstands wurde das Sediment ein zweites Mal Glycin/HCl-extrahiert. Die vereinigten Überstände (Teichonsäureextrakt) wurden gegen 0.01 M Tris/-HCl (pH 7,5) dialysiert und zur weiteren Reinigung an DEAE-Sephacel chromatographiert (2.11.1.3).

2.7 Präparation von Lipoteichonsäuren

Zur Isolierung von Lipoteichonsäuren wurde die von Fischer et al. (1983) beschriebene Methode in einer verkürzten und modifizierten Form angewendet (Ruhland und Fiedler, 1987). Eine Suspension aufgeschlossener Zellen wurde mit einem gleichen Volumen 80%igem wässrigem Phenol (w/v) versetzt und

bei 65 °C für 45 min gerührt.

Die abgekühlte Suspension wurde anschließend bei 2000 x g für 30 min zentrifugiert, die obere wässrige Phase entnommen und gegen 0,05 M Na-Acetat-Puffer (pH 4,0) dialysiert. Die weitere Aufreinigung von Lipoteichonsäuren erfolgte durch hydrophobe Chromatographie an Octyl- bzw. Phenyl-Sepharose CL-4B (2.11.1.2).

2.8 Präparation von Lipopolysacchariden

Lipopolysaccharide wurden nach dem von Westphal und Jann (1965) beschriebenen Vorgehen aus ganzen Zellen extrahiert. Die Zellen wurden unter Rühren mit einer homogenen Mischung aus Phenol und Wasser (1:1, v/v) bei 65-68 °C für 45 min behandelt. Nach dem Abkühlen erfolgte eine Phasentrennung durch Zentrifugation (2000 x g, 30 min). Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und gegen 0,01 M Tris/HCl-Puffer (1 M NaCl, pH 7,0) dialysiert. Die weitere Aufreinigung der Lipopolysaccharide erfolgte durch Chromatographie an Octyl-Sepharose CL-4B (2.11.1.2).

2.9 Präparation von Exoproteinen

Da die Präparation von Exoproteinen zum Teil mit pathogenen Bakterien der Gattung *Listeria* erfolgte, wurden sämtliche, durch Bakterien kontaminierte Geräte, Materialien und Medien entweder autoklaviert oder für 15 min auf 100 °C erhitzt.

2.9.1 Exoproteine von Kulturen auf festem Nährboden

Die Bakterien wurden auf Dialysemembranen (Visking, Fa. Serva), mit denen BHI-Agarplatten bedeckt worden waren, angezogen. Die Membranen sollten sowohl eine Diffusion der Exoproteine in das Medium als auch umgekehrt eine Diffusion von höhermolekularen Bestandteilen aus dem Medium zu den

Zellen verhindern. Zu diesem Zweck wurden aus Dialyseschl

schläuchen kreisrunde Membranen in der Größe einer Petri-
schale ausgeschnitten, diese mit Wasser befeuchtet, autokla-
viert und steril auf die Agaroberfläche gebracht. Nach einer
Trocknungszeit von ca. einem Tag bei RT wurden die Membranen
durch Ausstreichen von Bakterien beimpft. Nach 16 h Bebrü-
tung bei 37 °C wurden die Dialysmembranen mit einer
Pinzette abgezogen und das Zellmaterial zusammen mit even-
tuell vorhandenen Exoproteinen durch zweimaliges Waschen
mit je 2,5 ml physiologischer Kochsalzlösung abgespült. Die
Zellen wurden durch Zentrifugation (2.500 x g, 15 min)
sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen, auf 100 °C
erhitzt (15 min), gegen H₂O bidest. dialysiert und an-
schließend lyophilisiert. Der Nachweis von Exoproteinen er-
folgte durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.12.1.1).

2.9.2 Exoproteine von Kulturen in Flüssigmedium

Um Exoproteine aus Bakterienkulturen in bestimmten Wachs-
tumsphasen zu präparieren, wurden die Zellen als Flüssigkul-
turen entweder in Dialyseschl

schläuchen oder in ultrafiltrier-
tem Medium angezogen. In beiden Fällen sollten hochmoleku-
lare, durch Dialyse nicht entfernbare Substanzen (z. B.
Proteine) des Mediums von der Kulturflüssigkeit ferngehalten
werden, um saubere Präparationen zu ermöglichen. Das Wachs-
tum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 578 nm
verfolgt.

Die flüssigen Kulturen wurden bei 48.000 x g (20 min, 4 °C)
zentrifugiert, der Kulturüberstand abgenommen und für 15 min
im Wasserbad auf 100 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden
durch Sterilfiltration der Kulturflüssigkeit restliche Zel-
len quantitativ entfernt. Die Einengung des Kulturüberstands
sowie eine Abtrennung niedermolekularer Substanzen erfolgte
durch Amicon-Ultrafiltration (PM 10-Filter, Fa. Amicon). Für
die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Exopro-
teine mit Trichloressigsäure gefällt (2.17.5).

2.9.2.1 Anzucht in Dialyseschläuchen

In einen Erlenmeyerkolben (1 l) mit BHI-Medium (14,8 g BHI/300 ml) wurde ein Dialyseschlauch so eingeführt, daß das eine, verschlossene Ende in das Medium eintauchte, während das andere, offene Ende von innen nach außen über den Hals des Kolben gestülpt wurde. Der Erlenmeyerkolben wurde mit einem Stopfen verschlossen und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde steriles H₂O deion. (100 ml) in den Dialyseschlauch eingefüllt und der Kolben über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, um die Diffusion von niedermolekularen Medienbestandteilen in das Innere des Dialyseschlauches zu ermöglichen. Das Inoculum wurde in die Nährlösung im Dialyseschlauch eingebracht und bei 37 °C unter Schütteln angezogen. Eine "Dialyseschlauchkultur" von Bakterien zeigt Abbildung 8.

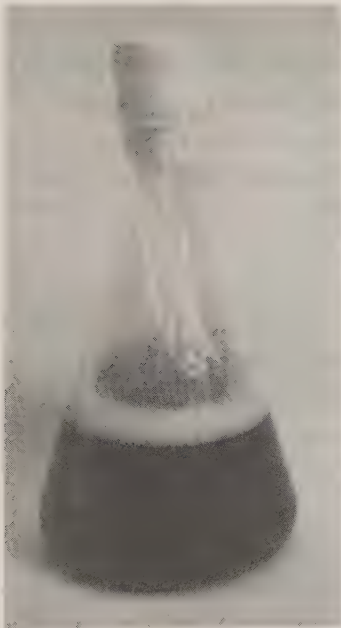


Abbildung 8:

Kultivierung von Bakterien im Dialyseschlauch zur Präparation von Exoproteinen.

2.9.2.2 Anzucht in ultrafiltriertem Medium

BHI-Medium (37 g/l) wurde an einer PM 10-Membran (Fa. Amicon) ultrafiltriert. Substanzen mit einem Molekulargewicht größer 10.000 D werden durch diesen Filter zurückgehalten. Das Filtrat wurde zur Anzucht der Zellen verwendet.

2.10 Hydrolysebedingungen

2.10.1 Hydrolysen mit Fluorwasserstoffsäure (HF)

Phosphodiesterbindungen in Lipoteichon- und Teichonsäuren wurden mit 60%iger (v/v) wässriger Flußsäure (Fa. Riedel-deHaen) bei 0 °C für 16 h hydrolysiert (Glaser und Burger, 1964). Nach der Inkubation wurde die HF in einem glasfreien System über NaOH-Plätzchen mit einer Oel-Vakuumpumpe abgezogen. Der Rückstand wurde in 0,2 ml kaltem H₂O bidest. aufgenommen und in gleicher Weise getrocknet. Nach erneuter Zugabe von H₂O bidest. (200 µl) wurde die Probe mit 1 M LiOH neutralisiert, zentrifugiert (10 min, 8000 x g) und der Überstand abgenommen. Zur quantitativen Erfassung wurde das Sediment mit Aqua bidest. gewaschen und wiederum zentrifugiert. Die vereinigten Überstände, welche die wasserlöslichen Lipoteichon- oder Teichonsäure-Bruchstücke enthalten, wurden zur Weiterverarbeitung getrocknet.

2.10.2 Hydrolysen mit Salzsäure (HCl)

Hydrolysen mit HCl erfolgten in zugeschmolzenen Glasampullen bei 100 °C. Die Spaltung von Peptidbindungen erfolgte mit 4 M HCl für 16 h (Totalhydrolyse). Glycosidische Bindungen und Alaninester wurden mit 2 M HCl (3 h) hydrolysiert. Nach dem Abkühlen wurden die Ampullen geöffnet und die Salzsäure im Luftstrom abgeblasen. Zur vollständigen Entfernung der HCl wurden die Proben in H₂O bidest. (200 µl) aufgenommen und erneut getrocknet.

2.10.3 Alkalische Hydrolyse von Lipiden

Die Glycolipidanteile von Lipoteichonsäuren wurden mit 1 M methanolischer KOH (1 ml) in verschließbaren Röhrchen für 4 h bei 100 °C verseift (James, 1960). Methanol wurde unter Vakuum am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 1 ml H₂O bidest. aufgenommen. Nach Ansäuern mit wenigen Tropfen 2,5 M H₂SO₄ wurden die freien Fettsäuren dreimal mit einem gleichen Volumen Petrolether (Siedepunkt: 40-60 °C) extrahiert. Die vereinigten Etherphasen wurden mit N₂ trockengeblasen.

Die wässrige, den Glycosidanteil enthaltende Phase, wurde mit NaOH neutralisiert und über einen Mischbettionenaustauscher (AG 11A8) deionisiert (2.11.1.4).

2.10.4 Alkalische Hydrolyse von Teichonsäuren

Die Hydrolyse von Teichonsäuren mit 1 M NaOH im Einschlußrohr für 3 h bei 100 °C erfolgte nach Adams et al. (1969). Nach Ende der Hydrolyse wurde der Ansatz über den Kationenaustauscher Dowex 50 WX8 neutralisiert (2.11.1.4).

2.10.5 Hydrolyse von Alaninestern

Alaninesterbindungen wurden durch Inkubation von Lipoteichonsäuren in 0,1 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) für 24 h bei 37 °C unter Toluolatmosphäre hydrolysiert (Fischer et al., 1980b).

2.11 Chromatographische Methoden

2.11.1 Flüssigchromatographie

Für die Säulenchromatographie wurden die Gele entsprechend den Angaben der Hersteller gequollen. Vor dem Füllen der Säulen wurden die Gelmaterialien mit dem entsprechenden

Puffer bzw. H_2O bidest. äquilibriert und anschließend entgast. Vor jedem neuen Chromatographielauf wurde mit mindestens fünf Säulenvolumina Puffer bzw. H_2O bidest. äquilibriert. Eine konstante Elutionsgeschwindigkeit wurde mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe (Fa. LKB) eingestellt. Einzelne Fraktionen wurden mit einem automatischen Fraktionskollektor (Fa. LKB) gesammelt. Sämtliche Säulenläufe erfolgten im Kühlraum bei $4^\circ C$.

2.11.1.1 Gelfiltration

Die Auftrennung von Lipoteichonsäure- oder Teichonsäurebruchstücken erfolgte durch Gelfiltration an Bio-Gel P-2 "extra fine" (Trennbereich: 200-1800 D, Fa. Bio-Rad). Proben von 0,5-1 ml wurden mit einer Pipette direkt auf das Gel aufgetragen.

Säule: 100 x 1,6 cm Glassäule (Fa. Pharmacia)

Gelbett: 90 cm

Elutionsmittel: H_2O bidest.

Elutionsgeschwindigkeit: 8 ml/h

Fraktionsvolumen: 1 ml

2.11.1.2 Affinitätschromatographie

Lipoteichonsäuren wurden durch Chromatographie an Octyl- oder Phenyl-Sepharose CL-4B (Fa. Pharmacia) gereinigt.

Säule: 30 x 2 cm Glassäule (Fa. Reichelt)

Gelbett: 22 cm

Elutionsgeschwindigkeit: 20 ml/h

Fraktionsvolumen: 5 ml

Elutionsverfahren: 1. Aufpumpen der Probe (gelöst in 0,05 M Na-Acetat, pH 4,0)

2. Elution mit 0,05 M Na-Acetat (pH 4,0)

3. Elution mit einem linearen Gradienten

von 0-66 % (v/v) Propanol in 0,05 M
Na-Acetat (pH 4,0)

Mischkammer: 170 ml Puffer

Reservoir: 192 ml Gemisch aus zwei
Teilen Propanol und einem Teil Puffer

Davon abweichende Elutionsverfahren, z. B. bei der Präparation von Lipopolysacchariden, sind in den Legenden der einzelnen Abbildungen des Ergebnisteils angegeben.

2.11.1.3 Anionenaustauschchromatographie

Die Reinigung von Teichonsäuren erfolgte durch Chromatographie an DEAE-Sephacel (Fa. Pharmacia). Zur Regeneration des Gels wurde mit mehreren Säulenvolumina 3 M NaCl eluiert.

Säule: 30 x 2 cm Glassäule (Fa. Reichelt)

Gelbett: 22 cm

Elutionsgeschwindigkeit: 16 ml/h

Fraktionsvolumen: 4 ml

Elutionsverfahren: 1. Aufpumpen der Probe (gelöst in 10 mM
Tris/HCl, pH 7,5)

2. Elution mit 10 mM Tris/HCl (pH 7,5)

3. Elution mit einem linearen Gradienten
von 0-2 M NaCl in 10 mM Tris/HCl
(pH 7,5)

2.11.1.4 Ionenaustauschchromatographie zur Neutralisation und Entsalzung von Proben

Die Deionisierung von Proben erfolgte mit Hilfe des Mischbettionenaustauscherharzes AG 11A8 (Fa. Bio-Rad). Als Säulendienten Pasteurpipetten, die mit Glaswolle abgedichtet und mit dem Harz gefüllt wurden (Säulenhöhe: 2-3 cm). Proben wurden direkt auf das Gel aufgetragen und bei langsamer Tropfgeschwindigkeit mit H₂O bidest. eluiert. Die Neutralisierung von alkalischen Hydrolysaten aus Teichonsäuren

erfolgte in gleicher Weise mit dem Kationenaustauscher Dowex 50 WX8 (Fa. Serva).

2.11.2 Gaschromatographie

2.11.2.1 Gaschromatographie von Zuckern

Die Bestimmung von Neutralzuckern, Amino-zuckern und Polyolen erfolgte durch Gaschromatographie. Polymeres Probenmaterial wurde durch HF-Behandlung (60%ige wässrige HF, 16 h, 0 °C) oder HF-Behandlung und anschließende saure Hydrolyse (2 M HCl, 3 h, 100 °C) in Monomere zerlegt. Die Aufbereitung der Proben wurde nach Albersheim et al. (1967) sowie Holligan und Drew (1971) durchgeführt.

Reduktion von Neutral- und Amino-zuckern:

Reduzierende Zucker, die in wässriger Lösung in zwei isomeren Formen (α u. β) vorliegen, ergeben nach Peracetylierung zwei Derivate, die unter den angewendeten Chromatographiebedingungen getrennt werden. Um eine optimale Trennung und Quantifizierung einzelner Zuckerkomponenten zu erreichen, wurden diese zu den entsprechenden Zuckeralkoholen reduziert.

Die getrockneten Proben wurden in 200 μ l 0,1 M NH_4OH gelöst und nach Zugabe von 200 μ l NaBH_4 -Lösung (20 mg/ml 0,1 M NH_4OH) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Durch Ansäuern mit Eisessig (1-2 Tropfen) wurde überschüssiges NaBH_4 zerstört. Das bei der Reduktion entstandene Borat wurde als Borsäuremethylester durch viermaliges Trocknen im Luftstrom mit je 1 ml Methanol verflüchtigt.

Acetylierung von Zuckeralkoholen:

Die Acetylierung der Zuckeralkohole zu Alditolacetaten erfolgte durch Zugabe von 0,3 ml Acetylierungsgemisch (ein Teil wasserfreies Pyridin und ein Teil Essigsäureanhydrid) zu den in Glasröhrchen getrockneten Proben. Für die an-

schließende Inkubation bei 60 °C im Dunkeln wurden die Reagenzgläser zugeschmolzen. Nach der Acetylierung wurden die Ansätze im Luftstrom vorsichtig getrocknet. Um restliches Pyridin zu entfernen, wurden die Proben zweimal mit je 1 ml Chloroform trocken geblasen.

Die Proben wurden mit 1 ml Chloroform und 1 ml H₂O bidest. versetzt, gut durchgemischt und zur Phasentrennung zentrifugiert. Die Alditolacetate lösen sich dabei in der Chloroformphase. Diese wurde entnommen und getrocknet. Zur Analyse am Gaschromatographen wurden die Proben in einer geeigneten Menge Chloroform aufgenommen und direkt eingespritzt.

Apparative Bedingungen (Schäffler, 1982):

Gaschromatograph: Fa. Packard, Modell 438 mit Flammenionisationsdetektor (FID)

Injektortemperatur: 270 °C

Detektortemperatur: 280 °C

Säulen-Temperaturprogramm: 140 °C, 2 min isotherm

140 °C - 270 °C, 6 °C/min

270 °C isotherme Endstufe (3 min)

Gase: N₂ : 20 ml/min

H₂ : 20 ml/min

synthetische Luft: 200 ml/min

Säule: 1000 x 2 mm Glassäule mit 3 % SP 2340 auf 100/200 Supelcoport (Fa. Supelco Inc.)

Auswertung:

Die Detektorsignale wurden mit Hilfe eines Integrators (Fa. Packard, Modell 604) aufgezeichnet und ausgewertet. Dabei wurden die Retentionszeiten der zu identifizierenden Komponenten mit denen eines Standardgemisches verglichen. Das Ergebnis der gaschromatographischen Auftrennung von Standardsubstanzen ist in Abbildung 9 wiedergegeben. Die quantitative Bestimmung von Substanzen wurde durch Mitführung eines internen Standards und einer externen Standardmi-

schung, die die Komponenten der Probe in definierten Mengen enthielt, erreicht.

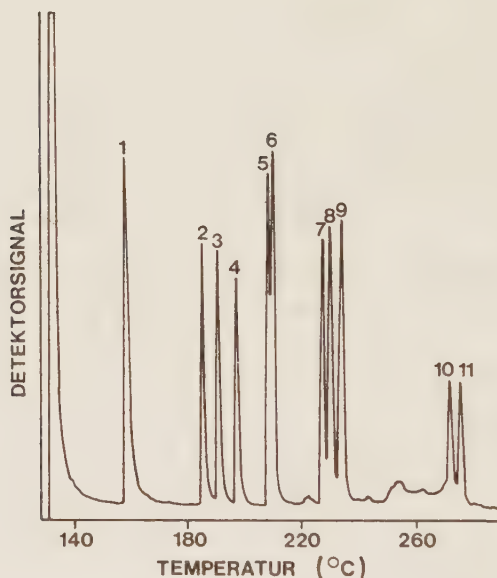


Abbildung 9:

Chromatogramm eines authentischen Standardgemisches von Zuckeralkoholen, Zuckern und Aminosukcern nach Reduktion und Acetylierung.

Die Detektorsignale entsprechen jeweils 10 nmol.

- (1), Tri-O-Acetyl-Glycerin; (2), Tetra-O-Acetyl-Erythrit;
- (3), Tetra-O-Acetyl-Threit; (4), Penta-O-Acetyl-Rhamnit;
- (5), Penta-O-Acetyl-Ribit; (6), Penta-O-Acetyl-Arabit;
- (7), Hexa-O-Acetyl-Mannit; (8), Hexa-O-Acetyl-Galactitol;
- (9), Hexa-O-Acetyl-Glucitol;
- (10), N-Acetyl-Penta-O-Acetyl-Glucosaminitol;
- (11), N-Acetyl-Penta-O-Acetyl-Galactosaminitol oder
N-Acetyl-Penta-O-Acetyl-Mannosaminitol

2.11.2.2 Gaschromatographie von Fettsäuren

Für die Gaschromatographie wurden Fettsäuren aus Glycolipiden und Lipoteichonsäuren durch alkalische Hydrolyse und anschließende Ansäuerung (2.10.3) freigesetzt.

Methylierung von Fettsäuren:

Freie Fettsäuren wurden mit Methyl-8-Konzentrat (Fa. Pierce) methyliert. Bis zu 50 mg Fettsäuren konnten mit 300 µl Methylierungsreagenz derivatisiert werden. Bei geringeren Mengen wurde entsprechend weniger Reagenz verwendet. Die Proben wurden in Methyl-8-Konzentrat gelöst und in verschlossenen Injektionsröhrchen bei 60 °C für 10-15 min erhitzt. Von den Methylierungsansätzen, welche die methylierten Fettsäuren enthielten, wurden 1-2 µl am Gaschromatographen analysiert.

Apparative Bedingungen:

Gaschromatograph: Fa. Packard, Modell 428 mit Flammenionisationsdetektor (FID)

Injektortemperatur: 270 °C

Detektortemperatur: 280 °C

Säulentemperatur: 160 °C oder 190 °C, isotherm

Gase: N₂: 30 ml/min

H₂: 30 ml/min

synthetische Luft: 300 ml/h

Säule: 2000 x 2 mm Glas- od. Metallsäule mit 3 % Silicon SE-30 auf Gaschrom Q, Körnung: 125-150 µ (Fa. Serva)

Auswertung:

Die vom Gaschromatographen gelieferten Signale wurden mittels eines Integrators (Fa. Packard, Modell 604) aufgezeichnet und berechnet.

Die Identifizierung unbekannter Fettsäuren erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten mit denen eines authentischen Fettsäurestandardgemisches (Abbildung 10) oder einer

identifizierten Fettsäuremischung aus *Streptomyces griseus*, die freundlicherweise Herr Dr. M. Kroppenstedt (Braunschweig) zur Verfügung stellte (Abbildung 11).

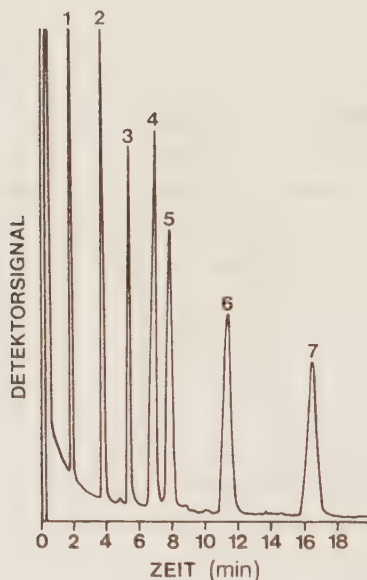


Abbildung 10:

Chromatogramm eines Fettsäurestandardgemisches nach Methylierung (Säulentemperatur: 190 °C).

Die Detektorsignale entsprechen jeweils 10 nmol.

- (1), Myristinsäure($C_{14:0}$)-Methylester;
- (2), Palmitinsäure($C_{16:0}$)-Methylester;
- (3), Heptadecansäure($C_{17:0}$)-Methylester;
- (4), Ölsäure($C_{18:1}$)- und Linolsäure($C_{18:2}$)-Methylester;
- (5), Stearinsäure($C_{18:0}$)-Methylester;
- (6), Nonadecansäure($C_{19:0}$)-Methylester;
- (7), Arachinsäure($C_{20:0}$)-Methylester

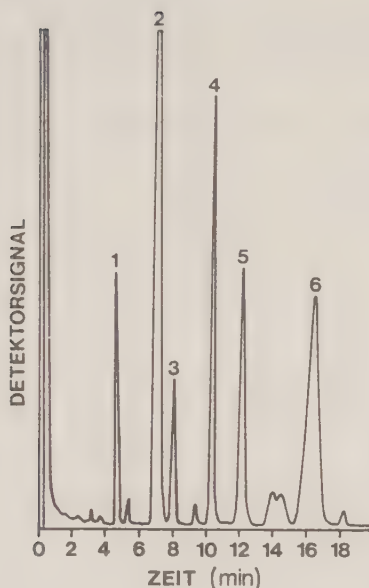


Abbildung 11:

Chromatogramm einer identifizierten Fettsäuremischung aus *Streptomyces griseus* nach Methylierung (Säulentemperatur: 160 °C).

- (1), 12-Methyltridecansäure(Iso-C_{14:0})-Methylester;
- (2), 12-Methyltetradecansäure(Anteiso-C_{15:0})-Methylester;
- (3), Pentadecansäure(C_{15:0})-Methylester;
- (4), 14-Methylpentadecansäure(Iso-C_{16:0})-Methylester;
- (5), Palmitinsäure(C_{16:0})-Methylester;
- (6), 14-Methylhexadecansäure(Anteiso-C_{17:0})-Methylester

2.11.3 Dünnschichtchromatographie

2.11.3.1 Analytische Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie (DC) wurden DC-Fertigplatten (Kieselgel 60) der Fa. Merck verwendet. Proben

wurden punktförmig aufgetragen und in einer mit Laufmittel gesättigten Kammer bei RT chromatographiert.

Folgende Lösungsmittelsysteme wurden verwendet:

Fließmittel A: Chloroform/Methanol/Wasser =

65:25:4 (v/v)

DC von Glycolipiden

(Nakano und Fischer, 1977)

Fließmittel B: Petrolether/Diethylether/Essigsäure =

90:20:1 (v/v)

DC von Glyceriden

(Stahl, 1967)

Fließmittel C: 1-Propanol/Ethylacetat/Wasser =

7:2:2 (v/v)

DC von Oligosacchariden

(Koch und Fischer, 1978)

Glycolipide und Glycoside wurden nach der Auftrennung durch DC mit Phenol/Schwefelsäure-Sprühreagenz nachgewiesen. Dazu wurden 3 g Phenol und 5 ml konzentrierte Schwefelsäure in 95 ml Ethanol gelöst. Nach dem Besprühen wurden die Platten für 10 min bei 100 °C nachbehandelt (Merck, 1970).

Der Nachweis von Glyceriden erfolgte mit Rhodamin B-Sprühlösung (Merck, 1970). Die Platten wurden mit einer Rhodamin B-Lösung (0,5 % in 96%igem Ethanol, w/v) besprüht und unter Beobachtung im langwelligen UV-Licht ausgewertet (Stahl, 1967).

2.11.3.2 Präparative Dünnschichtchromatographie

Zur Präparation von Glycolipiden und Glycosiden wurden die Proben bandenförmig aufgetragen. Nach erfolgter Chromatographie wurden die Spuren mit Alufolie abgedeckt und nur die äußeren Ränder der Banden mit Nachweisreagenz besprüht.

Das Kieselgel im Bereich von Banden wurde aus den Platten gekratzt. Die Elution von Glycolipiden erfolgte nacheinander mit folgenden Lösungsmittel-Systemen (Fischer, 1977):

1. Chloroform/Methanol (2:1, v/v), 0,1 % Essigsäure (v/v)
2. Chloroform/Methanol (1:1, v/v), 0,1 % Essigsäure (v/v)
3. Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4, v/v), 0,1 % Essigsäure (v/v)

Glycoside wurden aus Kieselgelplatten durch zweimalige Extraktion mit Methanol/Wasser (1:1, v/v) eluiert.

2.11.4 Aminosäurenanalysator

Aminosäuren und Amino Zucker konnten mit Hilfe eines voll-automatischen Aminosäurenanalysators (Fa. Biotronic, Modell LC 6001) durch Vergleich mit einem Standardgemisch identifiziert und quantitativ bestimmt werden. Die Auftrennung der Aminosäuren erfolgte über Kationenaustausch-Flüssigkeits-Chromatographie im Einsäulenverfahren entsprechend den Angaben der Fa. Biotronic.

2.12 Gelelektrophoretische Methoden

2.12.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde nach Lugtenberg et. al. (1975) durchgeführt. Es wurden Plattengele mit einer Dicke von 1,5 mm gegossen. Die Länge der Trenngele betrug zwischen 10 und 12 cm.

2.12.1.1 SDS-PAGE von Proteinen

Für die SDS-PAGE von Proteinen wurden Trenngele mit 10 % Acrylamid (0,1 % SDS, 0,373 M Tris/HCl, pH 8,8) und Sammelgele mit 4 % Acrylamid (0,1 % SDS, 0,125 M Tris/HCl, pH 6,8) hergestellt.

Die getrockneten Proben wurden vor dem Auftragen für 3 min

in Probenpuffer (2 % SDS, 10 % Glycin, 0,01 % Bromphenolblau und 1% Mercaptoethanol) gekocht. Der verwendete Elektrodenpuffer enthielt 0,025 M Tris, 0,19 M Glycin und 0,1 % SDS bei einem pH-Wert von 8,3.

Die Elektrophorese erfolgte bei RT mit einer Stromstärke von 12,5 mA für 30 min und wurde anschließend bis zur vollständigen Trennung (ca. 3-4 h) auf 25 mA erhöht. Proteinbanden wurden durch Anfärben mit Coomassie (2.12.4.1) oder Silbernitrat (2.12.4.2) sichtbar gemacht.

Molekulargewichte unbekannter Proteine wurden durch Vergleich mit gefärbten oder ungefärbten Proteinstandardsmischungen der Fa. Sigma (SDS-Molecular Weight Markers) bestimmt.

2.12.1.2 SDS-PAGE von Lipopolysacchariden

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Lipopolysacchariden erfolgte in der gleichen Weise und mit den gleichen Puffersystemen, wie unter 2.12.1.1 beschrieben. Die Trenngele enthielten jedoch 15 %, die Sammelgele 7,5 % Acrylamid (Peterson und Mc Groarty, 1985).

Lipopolysaccharidbanden wurden durch Periodat-Silber-Färbung (2.12.4.4) nachgewiesen.

2.12.1.3 SDS-PAGE von Lipoteichon- und Teichonsäuren

Für die SDS-PAGE von Lipoteichon- und Teichonsäuren wurden Trenngele mit einem kontinuierlichen Acrylamid-Gradienten von 7,5-15 % hergestellt. Die Trenngele wurden vertikal mit Hilfe von Gradientenmischgefäßen gegossen. Die Acrylamidkonzentration der Sammelgele betrug 5 %. Es wurden die gleichen Proben- und Elektrodenpuffer verwendet wie für die SDS-PAGE von Proteinen (2.12.1.1).

Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 10 wiedergegeben. Die Färbung der Gele erfolgte wie unter 2.12.4.3 beschrieben.

Tabelle 10:

Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gradientengele für die Elektrophorese von Lipoteichon- und Teichonsäuren (Dr. A. Bude, pers. Mitteilung).

Lösungen*	Trenngel (ml)		Sammelgel (ml)
	7,5 %	30 %	5 %
A	2,50	2,00	2,50
B	5,00	-	3,00
C	-	8,00	-
SDS (10 %)	0,20	0,16	0,18
H ₂ O bidest.	2,50	-	2,50
D	10,00	-	10,00
E	-	6,00	-

*A: 3 M Tris/HCl, pH 8,8, 0,23 % (v/v) TEMED

B: 30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) Bisacrylamid

C: 60 % (w/v) Acrylamid, 0,4 % (w/v) Bisacrylamid

D: 0,14 % (w/v) Ammoniumpersulfat

E: 0,18 % (w/v) Ammoniumpersulfat

SDS-Lösung: 10 % (w/v) SDS

2.12.2 Agarose-Gelelektrophorese

DNA und RNA wurden durch Elektrophorese in horizontalen 0,8%igen Agarosegelen (76 x 56 mm) nachgewiesen. Als Gel- und Laufpuffer diente, entsprechend Maniatis et al. (1982), TAE-Puffer (0,04 M Tris, 0,02 M Na-Acetate, 0,001 M EDTA, pH 8,2). Zur Sichtbarmachung von DNA- bzw. RNA-Banden wurde der Gellösung vor der Herstellung der Gele Ethidiumbromid (1 µg/ml) zugegeben. Fluoreszierende Banden konnten im langwelligeren UV-Licht (366 nm) nachgewiesen werden.

Die Proben wurden in Bromphenolblaulösung (20 mM Tris, 0,1 M EDTA, 70 % Saccharose, 1 mg Bromphenolblau pro 1 ml) aufgenommen und für 30-60 min bei 140 mA elektrophoretisiert.

2.12.3 Isoelektrische Fokussierung

Isoelektrische Fokussierungen erfolgten mit gebrauchsfertigen Gelen (Servalyt Precotes, 125 x 125 mm) der Fa. Serva. Die Gele umfaßten einen Bereich von pH 3-10. Der Anoden- und Kathodenpuffer stammten ebenfalls von der Fa. Serva. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Fokussierungsprogramm: Anfangsspannung: 200 V

Grenzstrom: 6 mA

Endleistung: 4 W

Endspannung: 1500 V

Nachfokussierung: 1 h

Die Gele wurden für ca. 10 min mit Coomassie gefärbt, anschließend kurz entfärbt und getrocknet. Die isoelektrischen Punkte der Proteine in Proben wurden durch Vergleich mit einer Proteintestmischung (Nr.9, Fa. Serva) ermittelt.

2.12.4 Färbung von Gelen

2.12.4.1 Coomassie-Färbung

Zum Nachweis von Proteinbanden wurden Gele für 30 min mit Coomassie Brilliant Blue G250 (0,63 g Coomassie gelöst in 113 ml Methanol, 113 ml H₂O und 46 ml Eisessig), wie von Weber und Osborn (1969) beschrieben, gefärbt. Die Entfärbung erfolgte mit Eisessig/Methanol/Wasser im Verhältnis 1:3:6 (v/v).

2.12.4.2 Silbernitrat-Färbung

Proteinbanden wurden mit 0,1 % Silbernitrat und anschließender Entwicklung mit 3 % Na₂CO₃ (0,02 % Formaldehyd) sichtbar gemacht. Die Färbung wurde mit 1 % Essigsäure gestoppt (Dzandu et al., 1984).

2.12.4.3 Phosphatfärbung mit "Stains-All"

Die Färbung von Lipoteichon- und Teichonsäuren in Gelen wurde mit "Stains-All" (Fa. Sigma; Green et al., 1973) durchgeführt. Die Färbelösung enthielt 40 mg "Stains-All", 80 ml Formamid, 200 ml Isopropanol, 4 ml 3 M Tris/HCl ad 800 ml Wasser bei einem pH-Wert von 8,8. Zur Entfernung von SDS wurden die Gele vor der Färbung mit einer 25%igen (v/v) wässrigen Isopropanollösung für 2,5 h bei 50 °C gewaschen.

2.12.4.4 Periodsäure-Silber-Färbung

Lipopolysaccharide in Polyacrylamidgelen wurden mit einer hochempfindlichen Periodsäure-Silber-Färbung nach Dubray und Bezard (1982) nachgewiesen. Die Gele wurden dazu mit wässriger Periodsäure und anschließend mit einer ammoniakalischen Silbernitratlösung behandelt.

2.13 Analytische Nachweismethoden

2.13.1 Bestimmung von Glycerin

Freies Glycerin wurde enzymatisch mit einem Enzymgemisch aus Pyruvatkinase/Lactatdehydrogenase (Fa. Sigma) und Glycerokinase (Fa. Boehringer) nachgewiesen (Bergmeyer, 1974).

2.13.2 Bestimmung von Glucose

Die Bestimmung von Glucose erfolgte nach Bergmeyer (1974) mit einem Gemisch aus den Enzymen Hexokinase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Fa. Boehringer).

2.13.3 Bestimmung von Galactose

Der enzymatische Nachweis von Galactose wurde mit Galactose-Dehydrogenase (Fa. Sigma) durchgeführt (Bergmeyer, 1974).

2.13.4 Bestimmung von Neutralzuckern

Neutralzucker in nicht hydrolysierten Proben wurden nach Dubois et al. (1956) bestimmt. Die Proben (200 µl) wurden mit 200 µl 5%igem (w/v) wässrigem Phenol und 1 ml konzentrierter H_2SO_4 unter Rühren versetzt. Nach 15 min Inkubation bei 30 °C erfolgte die Messung der Extinktion bei 490 nm. Der Zuckergehalt der Proben wurde auf der Basis von Extinktionswerten entsprechender Standardzucker berechnet.

2.13.5 Bestimmung von Phosphat

Die Bestimmung von organischem Phosphat erfolgte nach Ames und Dubin (1960). Die Proben (5-50 nmol Phosphat) wurden mit Magnesiumnitrat (10 %, w/v, in 96%igem Ethanol) verascht. Durch Zugabe von 300 µl 0,5 M HCl und Inkubation für 15 min bei 100 °C wurde bei der Veraschung entstandenes Pyrophosphat hydrolysiert. Zu den abgekühlten Proben wurden 700 µl Reaktionsgemisch (10%ige, w/v, Ascorbinsäurelösung in Wasser und 0,42%ige, w/v, Ammoniummolybdatlösung in 0,5 M H_2SO_4 im Verhältnis 1:7) gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C wurde die Extinktion bei 820 nm gemessen. Zur quantitativen Berechnung des Phosphatgehalts wurden Standardproben mitgeführt.

2.13.6 Bestimmung von 2-Keto-3-Desoxyoctonsäure (KDO)

Bei der Bestimmung von KDO wurde nach Brade et al. (1983) vorgegangen. KDO enthaltende Proben wurden mit 1 M HCl für 10-60 min oder 4 M HCl für 10-30 min bei 100 °C hydrolysiert. Die hydrolysierten und getrockneten Proben (5-100 nmol KDO) wurden mit 25 µl 1 M HCl, 225 µl H_2O bidest. und 125 µl 40 mM Periodsäure-Lösung (in 60 mM H_2SO_4) versetzt und für 30 min bei RT inkubiert. Das Abstoppen der Oxidation erfolgte durch Zugabe von 125 µl 0,2 M $NaAsO_2$ in 0,5 M HCl. Nach Zugabe von 250 µl frisch bereiteter,

0,6%iger (w/v) wässriger Thiobarbitursäure-Lösung wurden die Ansätze für 15 min gekocht. Anschließend wurde zu den heißen Proben jeweils 500 µl Dimethylsulfoxid gemischt und nach dem Abkühlen die Extinktion bei 549 nm gemessen.

2.13.7 Bestimmung von Uronsäure

Die Durchführung erfolgte nach Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973). Zu 0,2 ml unhydrolysierte Probe (5-100 nmol Uronsäure) wurden 1,2 ml 0,0125 M Na-Tetraborat-Lösung (in H₂SO₄ konz.) gegeben. Der Ansatz wurde gemischt, im Eis gekühlt und für 5 min im Wasserbad gekocht. Nach erneutem Abkühlen im Eiswasser wurden 0,02 ml einer 0,15%igen (w/v) m-Phenylphenol-Lösung (in 0,5%iger NaOH, w/v) zugemischt. Die Bestimmung der Extinktion bei 520 nm erfolgte nach 10 min. Als Standardsubstanz diente Glucuronsäure.

2.14 Enzymatische Behandlungen

2.14.1 Alkalische Phosphatase

Bei der Hydrolyse von Lipoteichon- und Teichonsäuren mit 2 M HCl (100 °C, 3 h) entstehende Phosphomonoester wurden mit alkalischer Phosphatase (Fa. Boehringer) gespalten. Die getrockneten Proben wurden dazu in Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 8,0) aufgenommen, mit 5 µl alkalischer Phosphatase versetzt und für 16 h bei 37 °C unter Toluolatmosphäre inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 5 min gekocht, zentrifugiert und die klaren Überstände für die Weiterbehandlung getrocknet.

2.14.2 Glycohydrolasen

Zur Bestimmung von endständigen Glycosylresten und der anomeren Konfiguration ihrer glycosidischen Anbindung wurden

folgende Glycohydrolasen und Inkubationsbedingungen (Bergmeyer, 1974) angewendet:

α -Glucosidase: 0,1 M Na-Acetatpuffer, 1 mM EDTA, pH 6,0, RT,
(Fa. Sigma)

β -Glucosidase: 0,1 M Na-Acetatpuffer, pH 5,0, 37 °C,
(Fa. Sigma)

α -Galactosidase: 0,1 M K-Phosphatpuffer, pH 6,5, RT,
(Fa. Boehringer)

β -Galactosidase: 0,1 M K-Phosphatpuffer, pH 7,0, RT,
(Fa. Sigma)

β -N-Acetylglucosaminidase: 10 mM Na-Citratpuffer, 0,01 %
(w/v) Rinderserumalbumin, pH 5,0,
37 °C, (Fa. Sigma)

Die Inkubation dauerte 48 h unter Toluolatmosphäre. Durch Kochen für 5 min wurden die Enzyme inaktiviert. Die Proben wurden zentrifugiert und anschließend im Überstand die freigesetzten Zucker enzymatisch oder mittels Gaschromatographie bestimmt.

2.14.3 D-Aminosäure-Oxidase

Zur Bestimmung der sterischen Konfiguration von Alanin wurden Hydrolysate (4 M HCl, 100 °C, 16 h) von Lipoteichonsäuren mit D-Aminosäure-Oxidase behandelt (Fa. Sigma). Die hydrolysierten und anschließend getrockneten Proben wurden in 100 μ l 0,1 M Natriumpyrophosphat-Puffer (pH 8,3), der Flavin-Adenin-Dinucleotid (0,5 mg/ml) enthielt, aufgenommen. Nach Zugabe von 10 μ l Enzymlösung folgte eine Inkubation für 4 h bei 37 °C unter Belüftung. Die Proben wurden für 5 min auf 100 °C erhitzt und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, getrocknet, in 150 μ l 0,1 M HCl aufgenommen und am Aminosäurenanalysator untersucht.

2.15 Periodat-Oxidation

Zur Strukturaufklärung wurden Teichonsäuren und ihre nicht-phosphorylierten Bruchstücke mit Natriummetaperiodat oxidiert. Periodat spaltet die Bindung zwischen vicinalen, nicht-substituierte Hydroxylgruppen tragenden C-Atomen unter Oxidation zu Carbonylgruppen.

Die Proben wurden nach Goldstein et al. (1965) mit einem zehnfachen Überschuß an 0,1 M NaIO_4 in Natriumacetat-Puffer (0,1 M, pH 5,0) versetzt und über Nacht bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die Zerstörung von überschüssigem NaIO_4 erfolgte durch Zugabe von 1 Mol Ethylenglykol pro 1 Mol Na-Periodat (1 h bei 37 °C).

Die Ansätze wurden anschließend mit 1 M Ammoniak alkalisiert (pH 9-10). Die Reduktion der durch Periodatoxidation entstandenen Carbonylgruppen erfolgte mit Na-Borhydrid.

Proben mit nicht-phosphorylierten Teichonsäurebruchstücken wurden mit einem Mischbettionenaustauscher deionisiert (2.11.1.4) und für die gaschromatographische Analyse aufbereitet (2.11.2.1).

2.16 Immunologische Methoden

2.16.1 Herkunft der O-Antiseren

Sämtliche, in dieser Arbeit verwendeten O-Antiseren gegen verschiedene *Listeria*-Stämme wurden dankenswerterweise von Herrn Prof. Dr. H. P. R. Seeliger (Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt.

Für die Herstellung der Seren waren Kaninchen mit durch Erhitzen (1 h, 100 °C) abgetöteten, nicht-begeißelten Zellen (Anzucht bei 37 °C) ohne Adjuvans intravenös immunisiert worden (Seeliger und Höhne, 1979).

2.16.2 Titerbestimmung von O-Antiseren

Die Titerbestimmung von O-Antiseren erfolgte nach Endl (1982). Von jeweils 50 µl Antiserum wurde in Fiolaxröhrchen (8 x 70 mm) eine 1:2-Verdünnungsreihe in PBS-Puffer (20 mM Natriumphosphat, pH 7,2, 0,9 % NaCl, 0,05 % NaN₃) hergestellt. Zu jedem Ansatz wurden 125 µl einer Suspension abgetöteter Zellen (optische Dichte bei 578 nm ca. 1,0) gegeben und die Röhrchen anschließend bei 37 °C für 24 h inkubiert. Flächenhafte Agglutination von Zellen zeigte eine positive Reaktion an. Eine zusätzliche Kontrolle erfolgte durch Anfertigung mikroskopischer Präparate. Der Titer des Serums entsprach dem Kehrwert der letzten Verdünnungsstufe, bei der noch Agglutination von Zellen erfolgte.

Als Kontrolle diente ein Ansatz mit 50 µl PBS-Puffer ohne Serum und 125 µl Zellsuspension.

2.16.3 Ouchterlony-Immundoppeldiffusion

Die Experimente wurden nach Ouchterlony (1968) durchgeführt. Die Immundoppeldiffusion von Lipoteichon- bzw. Teichonsäuren gegen entsprechende Antiseren erfolgte in 1%igen Agarosegelen in Borat-gepufferter Saline (Garvey et al., 1977). Die Diffusion von Antigen und Antiserum geschah über Nacht bei RT. Sofern keine sichtbaren Präzipitate zu erkennen waren, wurden die Gele mit Coomassie gefärbt (2.12.4.1).

2.16.4 Immunoblotting

Auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennte Proteine wurden mit Hilfe einer Blot-Kammer (Fa. Bio-Rad) elektrophoretisch (60 V, 2 h) auf Nitrocellulosefilter transferiert (Towbin et al. 1979). Der Blot-Puffer enthielt Tris (25 mM), Glycerin (192 mM), 20 % (v/v) Methanol und 0,1 % (w/v) SDS bei einem pH-Wert von 9,0. Der Proteintransfer wurde durch Anfärben

der Filter mit Amidoschwarz (0,1 % in Methanol/Wasser/Eisessig=45:45:10, v/v) kontrolliert. Entfärbt wurde mit 90%igem (v/v) wässrigem Methanol, das 2 % (v/v) Eisessig enthielt. Die Absättigung der Nitrocellulosefilter erfolgte mit 4 % (w/v) Milchpulver (Fa. Glücksklee) in Puffer [50 mM Tris/HCl, 0,95 % (w/v) NaCl, pH 7,5] für 1 h bei RT. Anschließend wurden die Filter zweimal 15 min mit Puffer A [10 mM Tris/HCL, 0,9 % (w/v) NaCl, 0,5 % (v/v) Triton X-100, 0,2 % (w/v) SDS, pH 7,4] gewaschen. Die Inkubation der Filter mit Antiserum erfolgte für 12 h bei RT in Puffer A, der je nach Titer bis zu 10 % (v/v) Serum und 1 % (w/v) Rinderserumalbumin (BSA) enthielt. Nach fünfmaligem Waschen der Filter (jeweils 15 min) mit Puffer A wurden sie mit 2,5 μ Ci 125 J-markiertem Protein A (Fa. Amersham-Buchler) in 30 ml Puffer A (1 % BSA) für 3 h bei RT behandelt. Anschließend wurden die Filter fünfmal mit Puffer A gewaschen, getrocknet und ca. 16 h auf einem Röntgenfilm (Xomat XR5, Fa. Kodak) exponiert.

2.17 Verschiedene Methoden

2.17.1 Dialysen

Für Dialysen wurden Visking-Dialyseschläuche (Fa. Serva) mit einem mittleren Porenradius von 24 Å verwendet. Dialysiert wurde bei 4 °C gegen das 50- bis 500-fache Volumen der Probe, wobei der Dialysepuffer bzw. das Dialysewasser zweibis dreimal gewechselt wurde.

2.17.2 Ultrafiltration

Ultrafiltrationen erfolgten mit Membranfiltern (PM 10) und Ultrafiltrationszellen der Fa. Amicon bei 4 °C unter N_2 -Druck. Substanzen mit einem Molekulargewicht von mehr als 10.000 D können den Filter nicht passieren.

2.17.3 Sterilfiltration

Für die Sterilfiltration von Lösungen wurden Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,2 μm (Fa. Sartorius) verwendet.

2.17.4 Präparation von Glycolipiden

Nach Behandlung von Lipoteichonsäuren mit 60%iger wässriger Flußsäure (0 °C, 16 h) wurden die wasserlöslichen HF-Spaltprodukte und die Glycolipidanteile durch zweimalige Extraktion mit Chloroform/Methanol/Wasser (1:1:0,9, v/v) getrennt (Nakano und Fischer, 1978). Die Glycolipide befinden sich dabei in der Chloroformphase.

2.17.5 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)

Proteine von Kulturüberständen wurden durch Zugabe von TCA (Endkonzentration: 7 %) bei 4 °C über Nacht präzipitiert. Durch Zentrifugation (2500 x g, 20 min, 4 °C) wurde ein Proteinsediment erhalten, das zweimal mit Diethylether extrahiert wurde, um restliche Trichloressigsäure zu entfernen.

2.17.6 Dinitrophenylierung von Zellwänden

Tryptisch gereinigte Zellwände (Trockengewicht: 2 mg) wurden in 1 ml wässriger NaHCO_3 -Lösung (1,25 %, w/v) und 2 ml frisch bereiteter ethanolischer 2,4-Fluordinitrobenzol (FDNB)-Lösung (1,5 %, w/v) durch Ultraschallbehandlung suspendiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation des Ansatzes für 6 h bei 37 °C unter Schütteln (Schleifer und Kandler, 1967). Die dinitrophenylierten Zellwände wurden abzentrifugiert (48.000 x g, 20 min) und nacheinander mit jeweils 3 ml 96%igem Ethanol, 50%igem Ethanol und Wasser gewaschen. Für die weitere Untersuchung wurden die Zellwände lyophilisiert.

2.17.7 Radioaktivitätsmessung

Die ^{14}C -markierten wässrigen Proben (0,2 ml) wurden mit 2 ml Szintillations-"Cocktail" (Rotiszint 22, Fa. Roth) versetzt und ihre Radioaktivität in einem Flüssig-Szintillationszähler (MR 300, Fa. Kontron) gemessen.

2.17.8 Bestimmung der Lipoteichonsäure-Carrier-Aktivität (LTC-Aktivität)

Der Nachweis der LTC-Aktivität von Lipoteichonsäuren erfolgte nach Fiedler und Glaser (1974a und b) mit Hilfe von Poly(Ribitphosphat)-Polymerase aus *Staphylococcus xylosus* (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn K. Zimmer, Mitarbeiter des Labors) und CDP- ^3H -Ribit.

Die Radioaktivität von gebildetem Poly- ^3H -Ribitphosphat diente als Maß für die LTC-Aktivität der untersuchten Lipoteichonsäuren.

2.17.9 Elektronenmikroskopie

Für die Transmissions-Elektronenmikroskopie wurden die Bakterienzellen folgendermaßen aufbereitet:

Fixierung mit Glutardialdehyd:

2,5 % Glutardialdehyd in Fixierungspuffer (100 mM Na-Cacodylat, 2 mM MgCl_2 , pH 7,3), 16 h bei 4 °C

Nachfixierung mit OsO_4 :

1 % Osmiumtetroxid in Fixierungspuffer, 2 h bei RT

"en bloc"-Kontrastierung:

mit 1 % Uranylacetat in 20 %igem wässrigem Aceton, 30 min bei RT

Entwässerung:

mit steigenden Acetonkonzentrationen von 2 % bis 100 %

Einbettung:

in "low viscosity epoxy resin" (Spurr, 1969), Polymerisation bei 70 °C

Schnitte:

mit Ultramikrotom Ultratome III (Fa. LKB), 50 nm Schnittdicke

Nachkontrastierung:

mit alkalischem Bleicitrat

Alle Ultradünnschnitte und elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Siemens Elmiskop 101) fertigte freundlicherweise Herr Dr. G. Wanner vom Botanischen Institut der Universität München an.

3 ERGEBNISSE

3.1 Vorkommen und Struktur von Lipoteichonsäuren in der Gattung *Listeria*

Die Stämme *L. monocytogenes* ATCC 15313 (SV 1/2a), *L. grayi* ATCC 19120, *L. murrayi* ATCC 25401 und *Jonesia denitrificans* (früher *L. denitrificans*) ATCC 14870 wurden bereits in einer vorhergehenden Arbeit auf das Vorkommen von Lipoteichonsäuren untersucht (Ruhland, 1984).

Mit Ausnahme von *Jonesia denitrificans* enthalten alle Stämme Lipoteichonsäuren. Der hydrophile Anteil besteht aus einer Poly(Glycerinphosphat)-Kette, wobei Glycerinreste teilweise mit D-Alanin substituiert vorliegen. Im Fall von *L. monocytogenes* tritt α -glycosidisch gebundene Galactose als zusätzlicher Substituent auf. Die Lipidanteile bestehen aus einem Galactose und Glucose enthaltenden Glycolipid. Das Fettsäurespektrum der Glycolipidanker enthält eine 15:0 anteiso und 17:0 anteiso verzweigte Fettsäure als Hauptkomponenten.

Eine detailliertere Strukturaufklärung sollte in vorliegender Arbeit vorgenommen werden. Um die Bedeutung von Lipoteichonsäuren für die Serologie und Taxonomie der Gattung *Listeria* zu klären, wurden weitere Vertreter, die unterschiedliche Spezies und Serovarietäten repräsentieren, in die Untersuchungen einbezogen. Dazu wurden die Stämme *L. monocytogenes* SLCC 5782 (SV 1/2a), *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b), *L. ivanovii* ATCC 19119 (SV 5), *L. innocua* ATCC 33090 (SV 6a), *L. seeligeri* SLCC 3954 (SV 1/2b) und *L. welshimeri* SLCC 5334 (SV 6a) ausgewählt.

3.1.1 Nachweis und Reinigung der Lipoteichonsäuren

Zum Nachweis und zur Reinigung von Lipoteichonsäuren wurden aufgeschlossene Zellen mit wässrigem Phenol extrahiert (2.7). Die wässrigen, dialysierten Phasen der Phenolex-

trakte wurden durch hydrophobe Chromatographie an Octyl-Sepharose CL-4B fraktioniert (2.11.1.2). In jeder zweiten Fraktion wurden der Phosphat- und Neutralzuckergehalt bestimmt. Alle untersuchten *Listeria*-Stämme lieferten ähnliche Elutionsprofile (Abbildung 12).

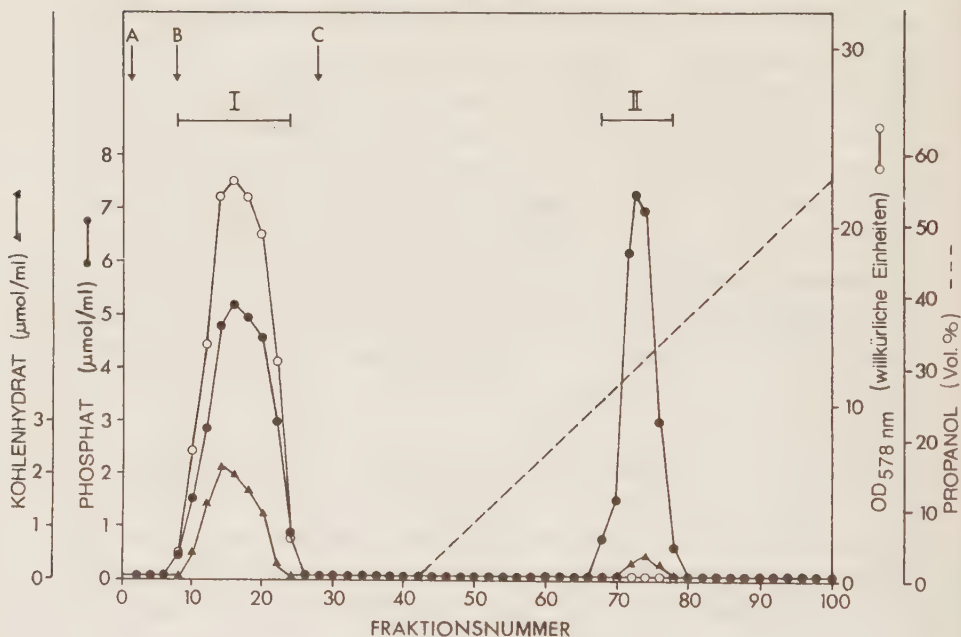


Abbildung 12:

Chromatographie des Phenol-extrahierten und dialysierten Materials aus *L. grayi* ATCC 19120 an Octyl-Sepharose CL-4B. Es wurde der Extrakt von 10 g Zellen (Naßgewicht) aufgetragen.

A: Auftragen der Probe

B: Elution mit 0,05 M Na-Acetat, pH 4,0

C: Elution mit einem linearen Gradienten von Propanol (0-66 %, v/v) in 0,05 M Na-Acetat, pH 4,0

Nicht mit dem Gel interagierendes Material (Gipfel I) zeichnete sich jeweils durch einen hohen Phosphat- und Kohlenhydratanteil sowie durch eine starke Absorption bei 280 nm aus. Die an Octyl-Sepharose bindenden amphiphilen Substanzen wurden bei einer Propanolkonzentration von ca. 30 % eluiert (Gipfel II). Sie enthielten Phosphat und Glycerin in äquimolaren Mengen (siehe unten). Estergebundenes D-Alanin und ein variabler Kohlenhydratanteil waren zusätzlich vorhanden. Diese Resultate sprachen zusammen mit der Tatsache, daß es sich um polymere Substanzen handelte, die durch Dialysemembranen zurückgehalten wurden, für das Vorliegen von Lipoteichonsäuren. Die Abwesenheit von Nucleinsäuren und Proteinen in Gipfel II war durch das Fehlen einer Absorption bei 280 nm angezeigt. In Proben einzelner Fraktionen, die mit 4 M HCl (100 °C, 16 h) hydrolysiert wurden, konnten am Aminosäurenanalysator neben Alanin keine weiteren Aminosäuren nachgewiesen werden. Es lagen demnach reine Präparationen von Lipoteichonsäuren vor.

3.1.2 Qualitative und quantitative Zusammensetzung der Lipoteichonsäuren

Die Lipoteichonsäure enthaltenden Fraktionen der Chromatographie an Octyl-Sepharose (Abbildung 12, Gipfel II) wurden jeweils vereinigt und gegen Aqua bidest. dialysiert. Um die Zusammensetzung der Lipoteichonsäuren zu bestimmen, wurden sie mit 60%iger wässriger Flußsäure (0 °C, 16 h) behandelt und die erhaltenen HF-Fragmente direkt oder nach Hydrolyse mit 2 M HCl (100 °C, 3 h) gaschromatographisch analysiert. Bei allen untersuchten Lipoteichonsäuren konnten nach HF- und HCl-Hydrolyse Glycerin, Galactose und Glucose nachgewiesen werden (Tabelle 11). Glycerin wurde bereits durch HF-Behandlung ohne anschließende Hydrolyse mit HCl freigesetzt und liegt demnach Phosphodiester-verknüpft in den Lipoteichonsäuren vor. Als zusätzliches HF-Fragment wurde bei allen Stämmen, mit Ausnahme von *L. grayi* und *L. murrayi*,

Galactopyranosyl(α 1-2)Glycerin nachgewiesen (Tabelle 11). Das Vorhandensein α -glycosidisch gebundener Galactose wurde zudem durch Freisetzung von monomerer Galactose aus den Lipoteichonsäuren mit Hilfe von α -Galactosidase bestätigt.

Tabelle 11:

Ergebnisse der gaschromatographischen Analyse von HF-Fragmenten der Lipoteichonsäuren verschiedener *Listeria*-Stämme vor und nach Hydrolyse mit 2 M HCl (100 °C, 3 h).

Spezies ^a	Stamm	Durch GC identifizierte Komponenten	
		HF-Fragmente	HF-Fragmente hydrolysiert
L. m. ^d	ATCC 15313	Glycerin	Glycerin
L. m.	SLCC 5782		
L. m.	ATCC 19115	(Galactose) ^b	
L. iv.	ATCC 19119		Galactose
L. i.	ATCC 33090	Galactosyl- ^c	
L. s.	SLCC 3954	(α 1-2)Glycerin	
L. w.	SLCC 5334		
L. mu. ^d	ATCC 25401	Glycerin	Glucose
L. g. ^d	ATCC 19120		

^aL. m.: *L. monocytogenes*; L. iv.: *L. ivanovii*; L. i.: *L. innocua*; L. s.: *L. seeligeri*; L. w.: *L. welshimeri*; L. mu.: *L. murrayi*; L. g.: *L. grayi*

^bIn geringen Mengen vorhanden

^cAuthentisches Galactosyl(α 1-2)Glycerin, das aus der Lipoteichonsäure von *Sc. lactis* NCDO 712 präpariert wurde, diente als Referenz (Fischer et al., 1980a).

^dDie Ergebnisse für die Stämme *L. monocytogenes* ATCC 15313, *L. murrayi* und *L. grayi* wurden aus einer früheren Arbeit übernommen (Ruhland, 1984).

Geringe Mengen freier Galactose, die nach HF-Behandlung der Lipoteichonsäuren auftraten, waren vermutlich das Produkt unspezifischer Hydrolyse glycosidischer Bindungen durch HF. Eine mögliche Ursache dafür könnten erhöhte Temperaturen (über 0 °C) sein, denen die Proben beim Abziehen der Flußsäure ausgesetzt sind.

Glycerin, Galactose und Glucose wurden nach Hydrolyse der Lipoteichonsäuren mit 60%iger wässriger HF (0 °C, 16 h) und 2 M HCl (100 °C, 3 h) enzymatisch quantifiziert. Die Bestimmung von Alanin erfolgte am Aminosäurenanalysator. Die Molverhältnisse der Komponenten sind in Tabelle 12 angegeben.

Tabelle 12:

Molare Verhältnisse der Komponenten zu Phosphat in den untersuchten Lipoteichonsäuren verschiedener *Listeria*-Stämme.

Spezies ^a	Stamm	Molare Verhältnisse der Komponenten zu Phosphat (=1,00)			
		Glycerin	Glucose	Galactose	D-Alanin
L. m.	ATCC 15313	1,08 ^c	0,04	0,21	0,31 ^c
L. m.	SLCC 5782	n.b. ^b	n.b. ^b	n.b. ^b	0,15
L. m.	ATCC 19115	n.b. ^b	n.b. ^b	n.b. ^b	n.b. ^b
L. iv.	ATCC 19119	1,06	0,04	0,15	0,36
L. i.	ATCC 33090	1,11	0,05	0,39	0,32
L. s.	SLCC 3954	1,17	0,03	0,22	0,26
L. w.	SLCC 5334	1,16	0,06	0,39	0,24
L. mu.	ATCC 25401	1,13 ^c	0,03	0,03	0,21 ^c
L. g.	ATCC 19120	1,10 ^c	0,05	0,05	0,27 ^c

^a Abkürzungen siehe Tabelle 11

^b nicht bestimmt

^c Die Ergebnisse für die Stämme *L. monocytogenes* ATCC 15313, *L. murrayi* und *L. grayi* wurden aus einer früheren Arbeit übernommen (Ruhland, 1984).

Ein in etwa äquimolares Verhältnis von Glycerin zu Phosphat geht konform mit dem Vorliegen von Poly(Glycerinphosphat)-Ketten. Glucose ist nur in geringen Mengen vorhanden und scheint nicht Komponente der hydrophilen Anteile, sondern eher der Lipidanteile zu sein. Alanin, das in der D-Konfiguration vorliegt (der Nachweis erfolgte mit Hilfe von D-Aminosäureoxidase), wurde bei allen Lipoteichonsäuren gefunden. Alanyl-glycerin war in den HF-Hydrolysaten mit Hilfe des Aminosäureanalysators nachzuweisen (Daten nicht angegeben). Aus den molaren Verhältnissen von D-Alanin zu Phosphat läßt sich eine Substitution von 20-40 % der Glycerinreste mit D-Alanin ableiten. In allen Lipoteichonsäuren, mit Ausnahme derer von *L. grayi* und *L. murrayi*, liegt im Vergleich zu Glucose ein hoher Galactosegehalt vor. Dies weist zusammen mit dem Auftreten von Galactosyl(α 1-2)-Glycerin in den HF-Hydrolysaten der Lipoteichonsäuren auf eine teilweise Substitution von Glycerinresten mit Galactose hin.

Mit Hilfe der Gelfiltration an Bio-Gel P-2 wurde versucht, Alanyl-glycerin und Galactosyl-glycerin als HF-Fragmente der Lipoteichonsäure von *L. innocua* nachzuweisen. Dazu wurde die Lipoteichonsäure mit 60%iger wässriger Flußsäure (0 °C, 16 h) hydrolysiert. Die hydrophilen HF-Bruchstücke wurden nach Extraktion mit Chloroform/Methanol/Wasser (1:1:0,9, v/v) an Bio-Gel P-2 chromatographiert. Das Elutionsprofil der Chromatographie zeigt Abbildung 13.

Alanyl-glycerin (Fraktionsbereich II) und Galactosyl-glycerin (Fraktionsbereich III) konnten nicht vollständig getrennt werden. Freies Glycerin eluierte jedoch in einem separaten Gipfel (Fraktionsbereich IV). Fraktionsbereich I enthielt vermutlich ein Fragment des Lipidankers der Lipoteichonsäure (siehe unten). In einzelnen Fraktionen konnte Glucose in einem nahezu äquimolaren Verhältnis zu Galactose nachgewiesen werden (Daten nicht angegeben).

Hinweise auf das Vorliegen von Alanyl-Galactosylglycerin in den HF-Hydrolysaten ergaben sich aufgrund des erhaltenen Elutionsprofils nicht.

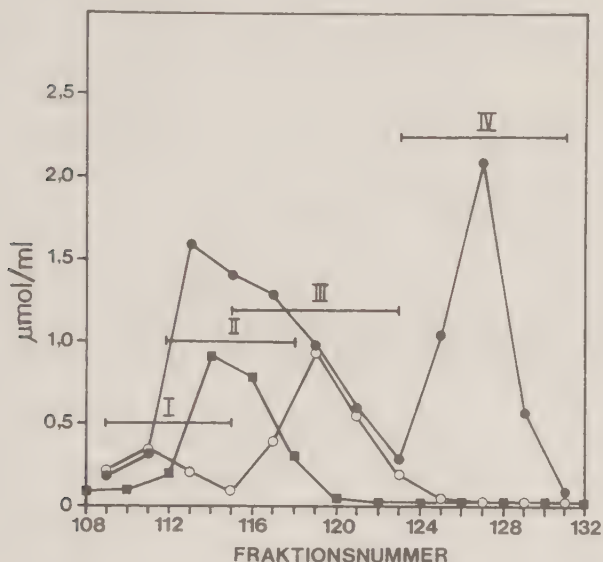


Abbildung 13:

Chromatographie von hydrophilen HF-Fragmenten der Lipoteichonsäure aus *L. innocua* ATCC 33090 an Bio-Gel P-2.

Bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 8 ml/h wurden Fraktionen mit 1 ml gesammelt. Galactose und Glycerin wurden nach Hydrolyse mit 2 M HCl (100 °C, 3 h) enzymatisch, Alanin am Aminosäurenanalysator nachgewiesen.

Glycerin ●—●, Galactose ○—○, Alanin ■—■

3.1.3 Strukturanalyse der Lipidanteile der Lipoteichonsäuren

Für die Präparation der Lipidanker wurden die Lipoteichonsäuren mit 60%iger wässriger HF (0 °C, 16 h) behandelt und die HF-Fragmente mit Chloroform/Methanol/Wasser (1:1:0,9,

v/v) extrahiert. Die Chloroformphasen, welche die lipophilen Anteile der Lipoteichonsäuren enthielten, wurden dünn-schichtchromatographisch analysiert (2.11.3). Als Referenzen dienten authentische Glycolipide aus *Lb. casei* (Abbildung 14).

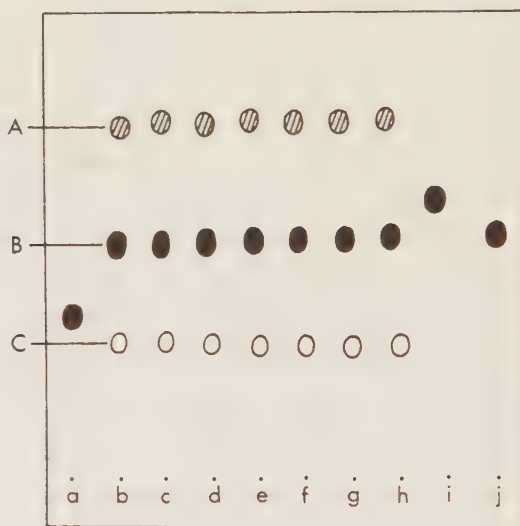


Abbildung 14:

Identifizierung der Glycolipidanteile der Lipoteichonsäuren verschiedener *Listeria*-Stämme durch Dünnschichtchromatographie.

Platte: Kieselgel 60

Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4, v/v)

Nachweisreagenz: Phenol/Schwefelsäure

(a), Glc(β1-6)Gal(α1-2)Glc(α1-3)-Diacylglycerin;

(b), *L. grayi*; (c), *L. murrayi*; (d), *L. innocua*;

(e), *L. monocytogenes* ATCC 15313; (f), *L. ivanovii*;

(g), *L. welshimeri*; (h), *L. seeligeri*;

(i), Glc(β1-6)Gal(α1-2), Acyl-6Glc(α1-3)-Diacylglycerin;

(j), Gal(α1-2)Glc(α1-3)-Diacylglycerin

Ein intensiv angefärbtes Fragment (B) sowie zwei schwach angefärbte Flecken (A und C) wurden bei allen Lipoteichonsäuren nachgewiesen.

Durch präparative Dünnschichtchromatographie wurden die einzelnen Fragmente isoliert und nach Hydrolyse mit 2 M HCl (100 °C, 3 h) am Gaschromatographen analysiert. Fragment B, das ein Laufverhalten wie Gal(α 1-2)Glc(α 1-3)-Diacylglycerin aufwies, enthielt Glycerin, Galactose und Glucose in äquimolaren Mengen und stellt den Glycolipidanker der Lipoteichonsäuren dar. Die weniger intensiv angefärbten Flecken A und C bestanden aus Glycerin, Galactose und Glucose (C) bzw. Glycerin und Glucose (A), wobei die Komponenten jeweils in äquimolaren Mengen vorlagen. Diese Bruchstücke entstanden aus Fragment B infolge unspezifischer Hydrolyse von Acyl- (C) oder Glycosidbindungen (A) durch HF (Ruhland, 1984).

Die Aufklärung der Anomerie glycosidischer Bindungen in den Glycolipidanteilen erfolgte durch Anwendung spezifischer Glycohydrolasen. Die freigesetzten Hexosen wurden enzymatisch nachgewiesen. Die Ergebnisse der sequentiellen Spaltung des Glycolipidanteils der Lipoteichonsäure aus *L. monocytogenes* ATCC 15313 sind in Tabelle 13 zusammengefaßt. Mit Hilfe von α -Galactosidase konnte von dem Lipidanker, der sich resistent gegenüber β -Galactosidase sowie α - und β -Glucosidase erwies, Galactose abgespalten werden. Erst nach Entfernung der Galactose war die Freisetzung von Glucose mit α -Glucosidase möglich. Dieses Resultat geht konform mit der Struktur α -Galactosyl- α -Glucosyl-Diacylglycerin, die nach dem dünnschichtchromatographischen Vergleich in den Glycolipidankern aller untersuchter Lipoteichonsäuren vorzuliegen scheint (Abbildung 14).

Die Lipoteichonsäuren der Stämme *L. monocytogenes* ATCC 15313, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* und *L. murrayi* wurden auf eine mögliche Substitution der Glycolipidanker

Tabelle 13:

Sequentielle Spaltung des Glycolipidanteils der Lipoteichonsäure aus *L. monocytogenes* ATCC 15313 durch spezifische Glycohydrolasen.

Schritt I		Schritt II	
Glycohydrolase	Freigesetzte Hexose	Glycohydrolase	Freigesetzte Hexose
α -Galactosidase	Galactose	α -Glucosidase	Glucose
		β -Glucosidase	-
β -Galactosidase	-		
α -Glucosidase	-		
β -Glucosidase	-		

mit Phosphatidylglycerin untersucht. Dazu wurden die HF-Bruchstücke der Lipoteichonsäuren mit Chloroform/Methanol/-Wasser extrahiert (2.17.4) und die Chloroformphasen dünnschichtchromatographisch auf das Vorhandensein von Diacylglycerin untersucht (Abbildung 15). Als Referenz diente ein Dipalmitoylglycerin-Racemat (Spur c), das bei der Dünnschichtchromatographie zwei eng benachbarte Flecken lieferte. In allen untersuchten Stämmen (Spuren d-h), mit Ausnahme von *L. grayi* und *L. murrayi*, konnten zwei Komponenten mit dem gleichen Laufverhalten wie das authentische Dipalmitoylglycerin-Racemat nachgewiesen werden, bei denen es sich offensichtlich um Diglyceride handelte. Glycolipide wandern unter den angewendeten Bedingungen nicht (Spur i). Die Identität der Diglyceride in den Proben wurde durch Freisetzung von Glycerin nach Verseifung mit 1 M KOH gezeigt. Eine Phosphatidylsubstitution der Glycolipidanteile von Lipoteichonsäuren dieser *Listeria*-Stämme ist demnach als wahrscheinlich anzusehen.

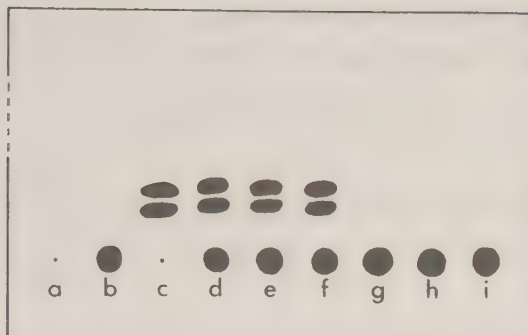


Abbildung 15:

Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Diacylglycerin als HF-Bruchstück der Lipoteichonsäuren verschiedener *Listeria*-Stämme.

Platte: Kieselgel 60

Laufmittel: Petrolether/Diethylether/Eisessig (90:20:1, v/v)

Nachweisreagenz: Rhodamin B

(a), Kontrolle; (b), Monopalmitoylglycerin (Racemat);
 (c), Dipalmitoylglycerin (Racemat); (d), *L. welshimeri*;
 (e), *L. seeligeri*; (f), *L. monocytogenes* ATCC 15313;
 (g), *L. murrayi*; (h), *L. grayi*; (i), Gal(α 1-2)Glc(α 1-3)-
 Diacylglycerin

Die Fettsäurezusammensetzung der Lipoteichonsäuren wurde nach Verseifung der lipophilen Anteile mit 1 M methanolischer KOH gaschromatographisch bestimmt und ist am Beispiel von *L. welshimeri* in Tabelle 14 angegeben. Das Fettsäurespektrum mit einer C_{15:0} anteiso und einer C_{17:0} anteiso verzweigten Fettsäure als Hauptkomponenten war bei allen untersuchten Lipoteichonsäuren sehr ähnlich.

Tabelle 14:

Durch Gaschromatographie bestimmte Fettsäurezusammensetzung der Lipoteichonsäure aus *L. welshimeri*.

Fettsäure	Prozentanteil an der Fettsäuregesamtmenge
15:0 anteiso	35,5
X ₁ ^a	2,4
16:0 iso	2,6
16:0	5,9
17:0 anteiso	32,9
X ₂ ^a	4,9
X ₃ ^a	4,9
18:0	6,7
X ₄ ^a	4,3

^aNicht-identifizierte Fettsäuren

3.1.4 Kettenlänge der Lipoteichonsäuren und Substitution von Glycerinresten

Die durchschnittliche Anzahl von Glycerinphosphatresten pro Lipoteichonsäuremolekül wurde aus dem molaren Verhältnis Phosphat:Glucose kalkuliert, unter der Annahme, daß nur ein Glucosylrest im Lipidanteil der Lipoteichonsäuren vorliegt (Tabelle 15). Die durchschnittlich 16 bis 33 Glycerinphosphateinheiten pro Molekül Lipoteichonsäure entsprechen je nach Stamm einer Poly(Glycerinphosphat)-Kettenlänge von 11-23 nm.

Der prozentuale Anteil von Glycerinphosphatresten, die mit Galactose oder D-Alanin substituiert sind, ist ebenfalls in Tabelle 15 angegeben. Der Substitutionsgrad berechnet sich aus dem Molverhältnis Substituent:Phosphat unter der Berücksichtigung, daß nur ein Galactosylrest im Glycolipidanker

der Lipoteichonsäuren vorhanden ist. Die Substitution von Glycerinphosphatresten mit D-Alanin liegt im Bereich von 21-36 % für die untersuchten *Listeria*-Stämme. Zwischen 11 und 33 % der Glycerinphosphateinheiten sind mit Galactose substituiert. Bei den Stämmen *L. grayi* und *L. murrayi* fehlt jedoch die Substitution mit Galactose. Über die Verteilung der Substituenten entlang der Poly(Glycerinphosphat)-Ketten kann keine Aussage gemacht werden.

Tabelle 15:

Durchschnittliche Länge der Poly(Glycerinphosphat)-Ketten und molare Verhältnisse von Galactose und D-Alanin zu Glycerinphosphatresten in den Lipoteichonsäuren der untersuchten *Listeria*-Stämme.

Spezies ^a	Stamm	Durchschnittliche Kettenlänge ^b	Molverhältnisse zu Glycerinphosphatresten	
			Galactose	D-Alanin
L. m.	ATCC 15313	23	0,17	0,31
L. iv.	ATCC 19119	23	0,11	0,36
L. i.	ATCC 33090	20	0,11	0,36
L. s.	SLCC 3954	29	0,19	0,26
L. w.	SLCC 5334	16	0,33	0,24
L. g.	ATCC 19120	20	0	0,27
L. mu.	ATCC 25401	33	0	0,21

^a Abkürzungen siehe Tabelle 11

^b Die durchschnittliche Anzahl der Glycerinphosphatreste pro Lipoteichonsäuremolekül wurde aus dem Molverhältnis Phosphat zu Glucose berechnet.

3.1.5 "Lipoteichonsäure-Carrier-Aktivität" der Lipoteichonsäuren

Das Vorhandensein von Lipoteichonsäuren in *Listeria*-Stämmen wurde durch Anwendung einer weiteren Methode bestätigt. Dabei wurde die Fähigkeit der Lipoteichonsäuren untersucht, bei der "in vitro"-Biosynthese von Poly(Ribitphosphat)-Teichonsäure als Akzeptor für Poly(Ribitphosphat) zu fungieren (Fiedler und Glaser, 1974a und b; Fiedler, 1981). Mit D-Alanin substituierte oder nicht-substituierte Lipoteichonsäuren wurden dazu mit CDP-³H-Ribit und Poly(Ribitphosphat)-Polymerase aus *S. xylosus* DSM 20266 inkubiert (2.17.8). Die Entfernung von estergebundenem D-Alanin erfolgte durch Dialyse der Lipoteichonsäuren gegen 0,1 M Tris/HCl bei pH 8,0.

Die D-Alanin-freien, jedoch teilweise Galactose-substituierten Lipoteichonsäuren zeigten im Vergleich mit der Lipoteichonsäure von *S. aureus* H (Fiedler und Glaser, 1974a und b) eine sehr gute Akzeptoraktivität bei der "in vitro"-Polymerisation von Ribitphosphat (Daten nicht angegeben). Die D-Alanin-substituierten Lipoteichonsäuren hingegen fungierten in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Fischer et al. (1980b) nur in geringem Maße als Akzeptor.

3.1.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei allen untersuchten *Listeria*-Stämmen konnten durch Phenol/Wasser-Extraktion und Chromatographie an Octyl-Sepharose CL-4B Lipoteichonsäuren isoliert werden. Die hydrophilen Anteile der Lipoteichonsäuren werden von Poly-(Glycerinphosphat)-Ketten gebildet, die durchschnittlich aus 16-33 Glycerinphosphatresten bestehen.

Die Glycerinphosphatreste sind teilweise am C₂-Atom mit

estergebundenem D-Alanin (21-36 %) und $\alpha(1-2)$ -glycosidisch-gebundener Galactose (11-33 %) substituiert. Bei *L. grayi* und *L. murrayi* sind die Galactosylsubstituenten jedoch abwesend. Die hydrophilen Poly(Glycerinphosphat)-Ketten sind kovalent mit einem Glycolipid verknüpft, das Galactose und Glucose enthält und ein dünnschichtchromatographisches Verhalten wie Gal($\alpha 1-2$)Glc($\alpha 1-3$)-Diacylglycerin aufweist. Bei allen Stämmen, ausgenommen *L. grayi* und *L. murrayi*, substituieren Phosphatidyl-Reste an den Glycolipidankern der Lipoteichonsäuren.

3.2 Untersuchungen zur Struktur der Teichonsäuren von L. monocytogenes ATCC 19115, L. innocua ATCC 33090 und L. innocua ATCC 33091

Fiedler et al. (1984) untersuchten 37 Stämme der Gattung *Listeria* auf das Vorkommen von Teichonsäuren. Aufgrund ihrer qualitativen und quantitativen Zusammensetzung wurde eine Korrelation zwischen den Teichonsäurestrukturen und den Serogruppen der Gattung *Listeria* vermutet. Es sollten deshalb die genauen Strukturen von Teichonsäuren verschiedener *Listeria*-Serovarietäten aufgeklärt werden. Für die Untersuchungen in vorliegender Arbeit wurden die Teichonsäuren der Stämme *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b), *L. innocua* ATCC 33090 (SV 6a) und *L. innocua* ATCC 33091 (SV 6b) ausgewählt.

Ihre quantitative Zusammensetzung wurde von Fiedler et al. (1984) wie folgt angegeben:

(1) Teichonsäure aus *L. monocytogenes* SV 4b:

Ribit : Glucosamin : Glucose : Galactose : Phosphat =
1,0 : 0,9 : 1,0 : 1,1 : 1,3

(2) Teichonsäure aus *L. innocua* SV 6a:

Ribit : Glucosamin : Galactose : Phosphat =
1,0 : 1,0 : 1,1 : 1,0

(3) Teichonsäure aus *L. innocua* SV 6b:

Ribit : Glucosamin : Glucose : Phosphat =
1,0 : 1,1 : 0,9 : 1,1

3.2.1 Reinigung der Teichonsäuren

Zur Präparation der Teichonsäuren wurden Trypsin-behandelte Zellwände von *L. monocytogenes* SV 4b, *L. innocua* SV 6a und *L. innocua* SV 6b mit Glycin/HCl extrahiert (2.6). Die weitere Reinigung erfolgte durch Dialyse des Teichonsäureextrakts und anschließende Chromatographie an DEAE-Sephacel (2.11.1.3). Das Elutionsprofil, das sich aus dem Phosphatgehalt einzelner Fraktionen ergibt, ist am Beispiel

von *L. monocytogenes* SV 4b in Abbildung 16 dargestellt. Phosphat enthaltendes Material eluierte in einem symmetrischen Gipfel bei einer NaCl-Konzentration von 0,5 M. Ähnliche Bilder lieferte die Chromatographie von Glycin/HCl-Extrakten der beiden anderen Stämme. Dieses chromatographische Verhalten und der hohe Phosphatgehalt wiesen auf das Vorliegen von Teichonsäuren hin. Der Anteil der Teichonsäuren am Zellwandgewicht betrug ca. 60 %.

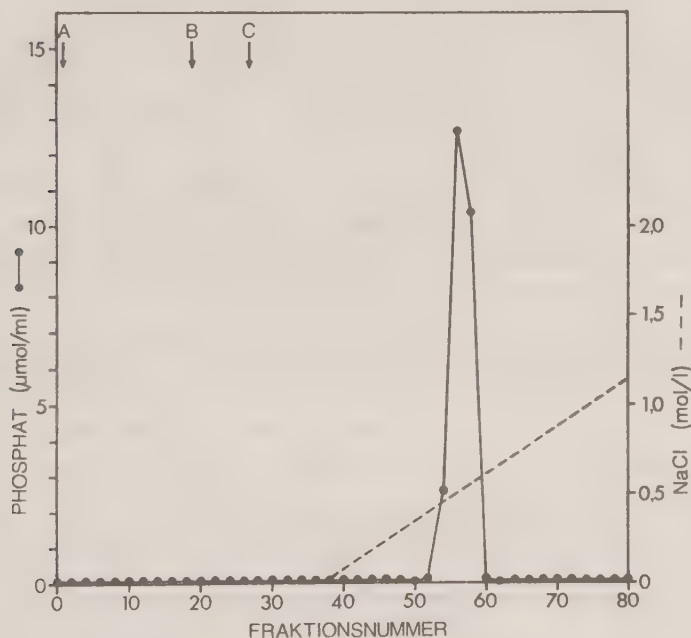


Abbildung 16:

Chromatographie der Glycin/HCl-extrahierten Teichonsäuren aus *L. monocytogenes* SV 4b an DEAE-Sephacel.

A: Auftragen der Probe

B: Elution mit Tris/HCl-Puffer (10 mM, pH 7,5)

C: Elution mit einem linearen Gradienten von 0-2 M NaCl in Tris/HCl-Puffer (10 mM, pH 7,5)

3.2.2 Qualitative und quantitative Zusammensetzung der Teichonsäuren

Die Teichonsäure enthaltenden Fraktionen wurden jeweils vereinigt, gegen H₂O bidest. dialysiert und lyophilisiert. Die Zusammensetzung der Teichonsäuren wurde nach HF-Behandlung (60%ige wässrige HF, 0 °C, 16 h) und darauffolgende HCl-Hydrolyse (2 M HCl, 100 °C, 3 h) bestimmt. Freie Zucker, Zuckeralkohole und Aminozucker wurden nach Reduktion und Acetylierung am Gaschromatographen nachgewiesen. Die quantitative Bestimmung erfolgte mit Hilfe eines internen Standards (Mannose) und einer externen Standardmischung. Phosphat wurde kolorimetrisch quantifiziert. Die molaren Verhältnisse der Komponenten in den Teichonsäuren sind in Tabelle 16 angegeben.

Die gefundenen Daten stimmen gut mit denen von Fiedler et al. (1984) überein. Ribit und Glucosamin sind in den untersuchten Teichonsäuren in nahezu äquimolaren Mengen enthalten; der Phosphatgehalt liegt etwas darüber. Die Teichonsäuren differieren jedoch im Anteil an Hexosen, die in etwas geringeren Mengen wie Ribit vorhanden sind. Die Teichonsäure

Tabelle 16:

Molare Verhältnisse der Komponenten zu Ribit in den untersuchten Teichonsäuren verschiedener *Listeria*-Stämme.

Stamm	Molverhältnisse der Komponenten zu Ribit			
	Galactose	Glucose	Glucosamin	Phosphat
L. monocytogenes SV 4b	0,7	0,7	1,1	1,3
L. innocua SV 6a	1.0	---	1,0	1,3
L. innocua SV 6b	---	0,8	1,1	1,3

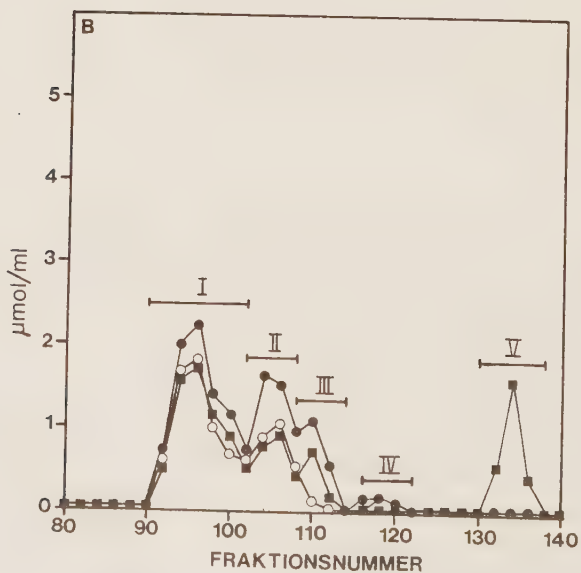
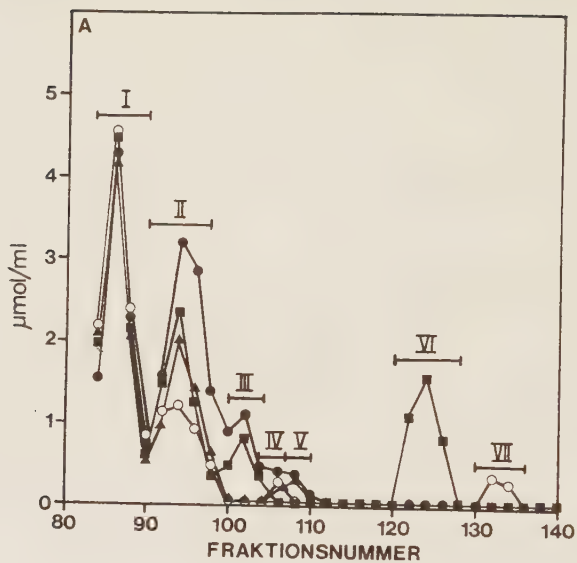
der Serovarietät 4b enthält sowohl Galactose als auch Glucose. Bei den Teichonsäuren von *L. innocua* kommen entweder nur Glucose (Serovarietät 6b) oder nur Galactose (Serovarietät 6a) vor.

3.2.3 Auftrennung von HF-Bruchstücken der Teichonsäuren durch Gelfiltration

Zur Strukturaufklärung wurden die Teichonsäuren (40 μ mol Phosphat) mit 60%iger wässriger HF (0 °C, 16 h) in ihre "Bausteine" zerlegt. Über Phosphodiesterbindungen verknüpfte Einheiten der Teichonsäuren werden dabei gespalten, während glycosidische Bindungen weitgehend erhalten bleiben. Die entstandenen HF-Bruchstücke wurden durch Chromatographie an Bio-Gel P-2 nach ihrer effektiven molekularen Größe aufgetrennt (Abbildung 17 A-C). Komponenten in den einzelnen Fraktionen wurden nach Hydrolyse mit 2 M HCl (100 °C, 3 h) durch Gaschromatographie quantifiziert.

Die HF-Fragmente der Teichonsäure von *L. monocytogenes* SV 4b trennten sich durch Chromatographie an Bio-Gel P-2 in sieben Gipfel auf (Abbildung 17 A).

Gipfel I enthielt Ribit, Glucosamin, Glucose und Galactose in äquimolaren Mengen. Das chromatographische Verhalten dieses Bruchstückes (A1) wies auf das Vorliegen eines Tetrasaccharids hin. Dies wurde durch die dünnschichtchromatographische Analyse bestätigt (siehe unten). In Gipfel II wurden neben Ribit, Glucosamin, Galactose und Glucose geringe Mengen Mannosamin (oder Galactosamin) nachgewiesen. Die Verteilung der Komponenten in diesem Fraktionsbereich sprach jedoch für ein Gemisch aus Teichonsäurebruchstücken. Gipfel III beinhaltete ein Fragment aus Ribit und Glucosamin im Molverhältnis 1:1 (Fragment B1). Die Gipfel IV und V, die sich nur unvollständig trennten, bestanden aus Glucosamin



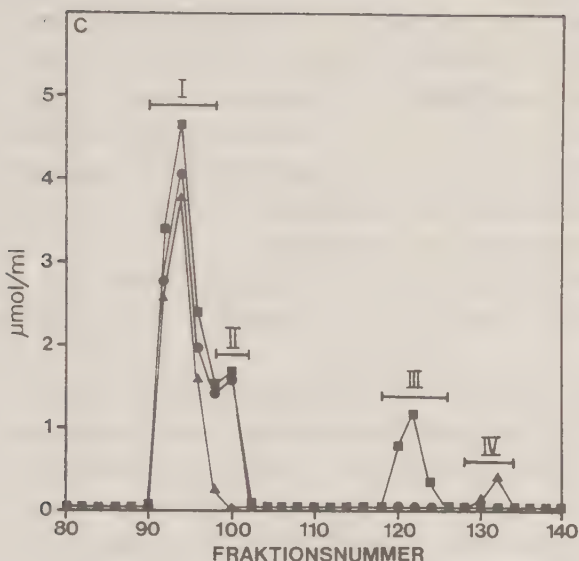


Abbildung 17 A-C:

Chromatographie von HF-Spaltprodukten der Teichonsäuren von *L. monocytogenes* SV 4b (A), *L. innocua* SV 6a (B) und *L. innocua* SV 6b (C) an Bio-Gel P-2.

Bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 8 ml/h wurden Fraktionen mit 1 ml gesammelt. Die Komponenten einzelner Fraktionen wurden nach Hydrolyse (2 M HCl, 100 °C, 3 h), Reduktion und Acetylierung gaschromatographisch nachgewiesen.

Ribit ■—■, Glucosamin ●—●, Glucose ▲—▲, Galactose ○—○

und Galactose bzw. Glucosamin und Glucose in jeweils äquimolaren Mengen. Durch HF freigesetztes Ribit und monomere Galactose wurden in den Gipfeln VI und VII gefunden.

Aufgrund dieser Ergebnisse können folgende Aussagen über die Struktur der Teichonsäure von *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b) getroffen werden:

- (1) Die größten "Bausteine" der Teichonsäure werden von Tetrameren aus Ribit, Glucosamin, Glucose und Galactose gebildet (Fragment A1). Dabei sind Glucosamin, Glucose und Galactose über glycosidische Bindungen direkt oder indirekt mit Ribit verknüpft. Die Tetramere selbst sind über Phosphodiester verbunden.
- (2) Das Auftreten des Fragments B1 aus Ribit und Glucosamin weist auf eine direkte Verknüpfung beider Komponenten hin.
- (3) Glucose und Galactose sind über glycosidische Bindungen direkt an Glucosamin gebunden. Dies wird durch die Dimere aus Glucosamin und Glucose (Gipfel V) bzw. Glucosamin und Galactose (Gipfel IV) angezeigt.

Die zuletzt genannten Fragmente, die nur in geringen Mengen auftraten, entstanden vermutlich durch unspezifische Spaltung glycosidischer Bindungen bei der HF-Behandlung. Daraus resultiert auch das Auftreten freien Ribits (Gipfel VI) und monomerer Galactose (Gipfel VII).

Die Chromatographie der HF-Bruchstücke der Teichonsäure von *L. innocua* SV 6a lieferte fünf Gipfel (Abbildung 17 B).

Gipfel I enthielt Ribit, Glucosamin und Galactose im Verhältnis 1:1:1. Das chromatographische Verhalten wies auf ein Trimer aus diesen Komponenten hin (Fragment A2).

Gipfel II bestand aus Ribit, Glucosamin, Galactose und geringen Mengen Mannosamin (oder Galactosamin). Vermutlich handelte es sich dabei um mehrere Fragmente, die unter den angewendeten chromatographischen Bedingungen nicht getrennt werden konnten.

In geringer Quantität traten die Gipfel III und IV auf, die Glucosamin und Ribit (Fragment B2), sowie Glucosamin und Galactose in äquimolaren Konzentrationen enthielten.

Monomeres Ribit eluierte in einem Gipfel (V).

Folgende Schlußfolgerungen können aufgrund der erhaltenen Daten für die Struktur der Teichonsäure von *L. innocua* ATCC 33090 (SV 6a) gezogen werden.

- (1) Das größte, über Phosphodiester verknüpfte Bruchstück der Teichonsäure besteht aus dem Trimer Galactosyl-Glucosaminyl-Ribit (A2).
- (2) Das Auftreten des Fragments Glucosaminylribit (B2) indiziert eine direkte glycosidische Bindung von Glucosamin an Ribit.
- (3) Galactose, die in einem Dimer zusammen mit Glucosamin gefunden wurde, ist glycosidisch an den Aminozyucker gebunden.

HF-Fragmente der Teichonsäure von *L. innocua* ATCC 33091 (SV 6b) wurden durch Chromatographie an Bio-Gel P-2 in vier Gipfel aufgetrennt (Abbildung 17 C).

Den Hauptbestandteil der Teichonsäurefragmente, die durch Spaltung von Phosphodiesterbindungen freigesetzt werden konnten, bildete ein Bruchstück, das Ribit, Glucosamin und Glucose in äquimolaren Mengen enthielt (Gipfel I, Fragment A3).

Das Auftreten von Glucosaminylribit (Gipfel II, Fragment B3) bestätigte wiederum eine direkte Verknüpfung von Glucosamin und Ribit. Ob Glucose glycosidisch an Glucosamin oder Ribit gebunden ist, konnte aufgrund dieser Resultate nicht entschieden werden.

3.2.4 Auftrennung von HF-Bruchstücken der Teichonsäuren durch Dünnschichtchromatographie

Einen weiteren Aufschluß über die Struktur der "Teichonsäurebausteine" sollte die dünnschichtchromatographische Auftrennung von HF-Fragmenten der Teichonsäuren liefern.

Bruchstücke aus einzelnen Fraktionen der Gelfiltrationen an Bio-Gel P-2 (Abbildung 17 A-C) wurden präparativ an Kiesel-

gel 60 aufgetrennt, anschließend aus dem Gel eluiert und nach Hydrolyse mit 2 M HCl (100 °C, 3 h) gaschromatographisch analysiert. Das Ergebnis der Dünnschichtchromatographie ist für *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b) in Abbildung 18 wiedergegeben.

Gipfel I (Abbildung 17 A, Fr. 86) enthielt das Fragment A1 mit einem Rf-Wert im Bereich zwischen Stachyose und Raffinose. Die Komponenten Ribit, Glucosamin, Glucose und Galactose lagen in äquimolaren Mengen vor.

In den Fraktionen von Gipfel II (Abbildung 17 A, Fr. 93-100) konnten fünf weitere Fragmente (C1-G1) nachgewiesen werden, die sich wie folgt zusammensetzten:

C1: Rit, GlcN, Gal, (1:1:1)

D1: GlcN, Gal, Glc, (1:1:1)

E1: Rit, GlcN, Glc, (1:1:1)

F1: GlcN, Glc, Gro, (1:1:1)

G1: GlcN, ManN (GalN), (1:1)

Aufgrund der Zusammensetzung der Fragmente C1, D1 und E1 wurde gefolgert, daß Glucose und Galactose an unterschiedlichen Positionen des Glucosaminyrestes substituieren.

Bei den Fragmenten F1 und G1 könnte es sich um Bestandteile der "linkage unit" handeln, über die eine Anknüpfung der Teichonsäure an das Peptidoglycan erfolgt. Nach Kaya et al. (1985a) ist die Teichonsäure aus *L. monocytogenes* EGD über Glc(β1-3)Glc(β1-1/3)Gro-P-(3/4)-ManNAc(β1-4)GlcNAc mit dem C₆-Atom von N-Acetylmuraminsäure verknüpft.

Glucosaminy-Ribit (Fragment B1) konnte durch das Phenol/-Schwefelsäure-Sprühreagenz nicht nachgewiesen werden.

Im Falle von *L. innocua* ATCC 33090 (SV 6a) lieferte die dünnschichtchromatographische Analyse von Fraktionen der Bio-Gel P-2-Chromatographie (Abbildung 17 B) drei Bruchstücke, die aus Ribit, Glucosamin und Galactose (A2), Glucosamin und Galactose (C2) sowie Glucosamin und Mannosamin oder Galactosamin (D2) bestanden (Abbildung 19). Die Komponenten lagen jeweils im Verhältnis 1:1 vor. Fragment C2

weist darauf hin, daß Galactose am Glucosamin und nicht am Ribit substituiert. Bruchstück D2 stammt vermutlich aus der "linkage unit".

HF-Spaltstücke der Teichonsäure von *L. innocua* ATCC 33091 (SV 6b) wurden nicht durch DC analysiert.

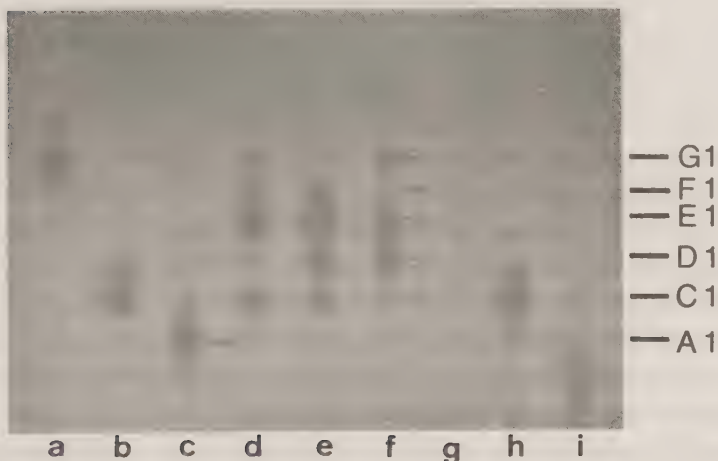


Abbildung 18:

Dünnschichtchromatographie von HF-Bruchstücken der Teichonsäure von *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b).

Platte: Kieselgel 60

Laufmittel: 1-Propanol/Ethylacetat/Wasser (7:2:2, v/v)

Nachweisreagenz: Phenol/Schwefelsäure

Es wurden Standardzucker und einzelne Fraktionen der Chromatographie an Bio-Gel P-2 aufgetragen (Abbildung 17 A).

(a), Galactose (200 nmol); (b), Melibiose (200 nmol); (c), Fraktion 86 (50 µl); (d), Fraktion 93 (100 µl); (e), Fraktion 94 (100 µl); (f), Fraktion 96 (100 µl); (g), Fraktion 102 (100 µl); (h), Raffinose (200 nmol); (i), Stachyose (200 nmol)

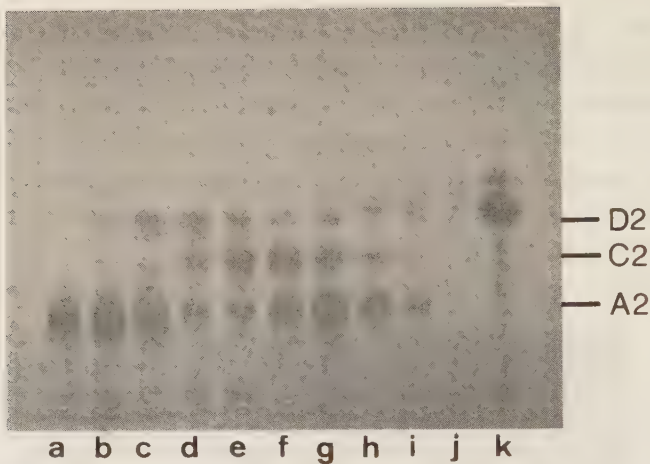


Abbildung 19:

Dünnschichtchromatographie von HF-Bruchstücken der Teichonsäure von *L. innocua* ATCC 33090 (SV 6a).

Chromatographiebedingungen: wie in Abbildung 18

Es wurden Galactose (100 nmol) als Standard und einzelne Fraktionen (je 100 µl) der Chromatographie an Bio-Gel P-2 aufgetragen (Abbildung 17 B).

(a), Fraktion 94; (b), Fraktion 96; (c), Fraktion 98;
 (d), Fraktion 100; (e), Fraktion 102; (f), Fraktion 104;
 (g), Fraktion 106; (h), Fraktion 108; (i), Fraktion 110;
 (j), Fraktion 112; (k), Galactose

3.2.5 Glycohydrolasebehandlung von HF-Bruchstücken der Teichonsäuren

Mit Hilfe von spezifischen Exoglycohydrolasen wurden endständige Zucker in Glycosiden identifiziert. Zugleich konnte die Anomerie ihrer glycosidischen Anbindung nachgewiesen werden.

Durch Chromatographie an Bio-Gel P-2 präparierte HF-Bruchstücke von den Teichonsäuren wurden mit entsprechenden Glycohydrolasen behandelt. Dabei freigesetzte Zucker,

Zuckeralkohole oder Aminosucker wurden nach Reduktion und Acetylierung gaschromatographisch nachgewiesen. Entsprechende Standardglycoside wurden mitbehandelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 zusammengefaßt.

Bei allen drei untersuchten Teichonsäuren konnten aus den Fragmenten B1, B2 und B3 mit β -N-Acetylglucosaminidase Ribit und Glucosamin in äquimolaren Mengen freigesetzt werden. Demnach liegt Glucosamin N-acetyliert vor und ist β -glycosidisch an Ribit gebunden.

Von den Glycosiden A1 (*L. monocytogenes* SV 4b) und A2 (*L. innocua* SV 6a) wurde mit α -Galactosidase Galactose abgespalten. Durch Anwendung von β -N-Acetylglucosaminidase konnten aus den Glycosiden A1, A2 und A3 keine Komponenten freigesetzt werden. Dies ist darauf zurückzuführen, daß Glucose und/oder Galactose am N-Acetylglucosamin substituieren. Wie aus Tabelle 17 hervorgeht, konnte von den Glycosiden A1 und A3 weder mit α -Glucosidase noch β -Glucosidase Glucose abgespalten werden. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der postulierten Endständigkeit von Glucose. Es ist deshalb anzunehmen, daß die Fragmente A1 und A3 in einer Konformation vorliegen, in der Glucose für die entsprechende Glucosidase nicht zugänglich ist beziehungsweise nicht als Substrat erkannt wird. Von einem Fragment der Teichonsäure von *L. ivanovii* ATCC 19119 (SV 5), das Ribit, N-Acetylglucosamin und Glucose enthält, konnte Glucose erst nach Entfernung des N-Acetylrestes mit β -Glucosidase abgespalten werden (Jochmus, 1986). Demnach inhibiert der N-Acetylrest am N-Acetylglucosamin auch hier möglicherweise die Aktivität von β -Glucosidase.

Die Abhängigkeit der Glycohydrolase-Aktivität von der Konformation des Substrats zeigte sich auch, wenn Teichonsäure und Teichonsäurebruchstücke von *L. monocytogenes* SV 4b mit α -Galactosidase behandelt wurden. Während Galactose von den Bruchstücken nahezu quantitativ abgespalten wurde, betrug der Anteil an freigesetzter Galactose im Falle von Teichonsäure nur 12 %.

Tabelle 17:

Ergebnisse der Glycohydrolasebehandlung von nicht-phosphorylierten Teichonsäurebruchstücken.

Stamm	Probe	Glycohydrolase	Freigesetzte Komponenten ^a
L. monocytogenes SV 4b	Fragm. A1 ^b (Rit, GlcN, Gal, Glc)	α -Glucosidase	---
		β -Glucosidase	---
		α -Galactosidase	Gal
		β -Galactosidase	---
	Fragm. B1 (Rit, GlcN)	β -N-Acetylglu- cosaminidase	---
		β -N-Acetylglu- cosaminidase	Rit, GlcN
L. innocua SV 6a	Fragm. A2 (Rit, GlcN, Gal)	α -Galactosidase	Gal
		β -Galactosidase	---
		β -N-Acetylglu- cosaminidase	---
	Fragm. B2 (Rit, GlcN)	β -N-Acetylglu- cosaminidase	Rit, GlcN
L. innocua SV 6b	Fragm. A3 (Rit, GlcN, Glc)	α -Glucosidase	---
		β -Glucosidase	---
		β -N-Acetylglu- cosaminidase	---
	Fragm. B3 (Rit, GlcN)	β -N-Acetylglu- cosaminidase	Rit, GlcN

^aDie Komponenten wurden nach erfolgter Glycohydrolasebehandlung durch Gaschromatographie identifiziert.

^bDurch Behandlung mit α -Glucosidase, β -Glucosidase oder β -N-Acetylglucosaminidase konnten nach Abspaltung von Galactose keine weiteren Komponenten freigesetzt werden.

Aus den bisherigen Resultaten können für die über Phosphodiester verknüpften Einheiten der untersuchten Teichonsäuren folgende Strukturen abgeleitet werden: [Galactosyl(α 1-?)]-[Glucosyl(?1-?)]N-Acetylglucosaminy(β 1-?)Ribit für *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b), [Galactosyl(α 1-?)]N-Acetylglucosaminy(β 1-?)Ribit für *L. innocua* ATCC 33090 (SV 6a) und [Glucosyl(?1-?)]N-Acetylglucosaminy(β 1-?)Ribit für *L. innocua* ATCC 33091 (SV 6b).

3.2.6 Periodatbehandlung der Teichonsäuren und ihrer Bruchstücke

Durch Na-Periodat werden Zucker und Zuckeralkohole zwischen benachbarten C-Atomen, die freie Hydroxylgruppen aufweisen, oxidativ gespalten. Strukturelle Hinweise ergeben sich durch Identifizierung von nicht-gespaltenen Komponenten und von Spaltprodukten. Teichonsäuren oder ihre nicht-phosphorylierten Bruchstücke wurden mit Na-Periodat oxydiert (Smith-Abbau) und anschließend reduziert. Die Spaltprodukte wurden hydrolysiert (2 M HCl, 100 °C, 3 h). Im Fall von Teichonsäuren wurden die Proben vor der HCl-Hydrolyse einer HF-Behandlung (60%ige wässrige Flußsäure, 0 °C, 16 h) unterzogen. Der Nachweis der Periodat-Abbauprodukte erfolgte gaschromatographisch nach Reduktion und Acetylierung.

Die Ergebnisse der Na-Periodatspaltung sind für die zu untersuchenden *Listeria*-Stämme in Tabelle 18 zusammengefaßt. Bei der Periodatoxidation der Teichonsäuren wurden Ribit, Glucose und Galactose vollständig gespalten. Diese Komponenten sind demnach in den Teichonsäuremolekülen so integriert, daß sie freie vicinale OH-Gruppen aufweisen. Neben nicht-identifizierbaren, vermutlich phosphorylierten Abbauprodukten konnte Glycerin nachgewiesen werden. N-Acetylglucosamin erwies sich in allen Fällen resistent gegenüber dem Smith-Abbau. In den nicht-phosphorylierten Fragmenten (A1, E1, A2 und A3) der drei untersuchten Teichonsäuren zeigte sich

Tabelle 18:

Ergebnisse der Na-Periodatbehandlung der Teichonsäuren und Teichonsäurefragmente von *Listeria*-Stämmen der Serovarietäten 4b, 6a und 6b.

Stamm	Probe	Identifizierte Komponenten ^a
<i>L. monocytogenes</i> SV 4b	Teichonsäure	Gro, GlcN
	Fragment A1	Gro, GlcN
	(Rit, GlcN, Gal, Glc)	
	Fragment E1	Gro, GlcN
	(Rit, GlcN, Glc)	
<i>L. innocua</i> SV 6a	Teichonsäure	Gro, GlcN
	Fragment A2	GlcN ^b
	(Rit, GlcN, Gal)	
<i>L. innocua</i> SV 6b	Teichonsäure	Gro, GlcN
	Fragment A3	Gro, GlcN
	(Rit, GlcN, Glc)	
	Fragment B3	---
	(Rit, GlcN)	

^aDie Komponenten wurden nach Periodatoxidation und Hydrolyse mit 2 M HCl (100 °C, 3 h) gaschromatographisch identifiziert.

^bGlycerin ging vermutlich als hochflüchtiges Tri-O-Acetyl-glycerin bei der Aufbereitung der Proben verloren.

N-Acetylglucosamin als einzige Komponente ebenfalls stabil gegenüber Periodat. In dem Fragment N-Acetylglucosaminyl-ribit (B3) hingegen wurde N-Acetylglucosamin durch Periodat oxidiert. Daraus ist zu folgern, daß Glucosamin in den Teichonsäuren aus *L. innocua* der Serovarietät 6a und 6b am

~
C₃- oder C₄-Atom mit Galactose bzw. Glucose substituiert ist. Die Stabilität von N-Acetylglucosamin gegenüber Na-Periodat im Fragment E1 der Teichonsäure aus *L. monocytogenes* SV 4b zeigt an, daß auch in diesem Fall Glucose an das C₃- oder C₄-Atom des N-Acetylglucosamins gebunden ist. Die Anbindung von Galactose am N-Acetylglucosamin war infolge der fehlenden Abspaltung von Glucose durch Glucosidase auf diesem Weg nicht zu erkennen.

3.2.7 Untersuchungen zur Verknüpfungsweise der Teichonsäure-einheiten über Phosphodiesterbindungen

Es sollte untersucht werden, ob es sich bei den vorliegenden Teichonsäuren um den klassischen Poly(Ribitphosphat)-Typ handelt, bei dem die glycosidisch substituierten Ribitreste über Phosphodiesterbindungen direkt verknüpft sind, oder ob Glycosylreste als integrale Bestandteile der Teichonsäureketten auftreten.

Um diese Frage zu beantworten, wurde versucht, phosphorylierte Komponenten der Teichonsäuren nach Hydrolyse direkt oder indirekt nachzuweisen. Zunächst wurden die Teichonsäuren mit 2 M HCl (100 °C, 3 h) hydrolysiert. In Parallelansätzen erfolgte eine zusätzliche Behandlung mit 60%iger wässriger Flußsäure (0 °C, 6 h). Anschließend wurden die Teichonsäurekomponenten am Gaschromatographen quantifiziert. Die Konzentrationen einzelner Komponenten nach HCl-Hydrolyse allein wurden mit denen nach HCl- und HF-Behandlung (= Gesamtmenge, 100 %) verglichen. Die prozentualen Anteile von Ribit betrugen in den nicht HF-behandelten Proben ca. 20 % für *L. monocytogenes* SV 4b, 40 % für *L. innocua* SV 6a und 39 % für *L. innocua* SV 6b. Demnach lag Ribit nach HCl-Hydrolyse zu 60-80 % phosphoryliert vor. Die Konzentration aller anderen Teichonsäurebestandteile war in den Parallelansätzen nahezu unverändert. Daraus wurde geschlossen, daß Ribit an den Phosphodiesterbindungen

beteiligt und somit integraler Bestandteil der Teichonsäureketten ist.

Glucosamin, das in den untersuchten Teichonsäuren in äquimolaren Mengen zu Ribit vorkommt, könnte möglicherweise neben Ribit ebenfalls in die Ketten integriert sein. Um dies zu untersuchen, wurden die Teichonsäuren stark alkalisch hydrolysiert (2 M NaOH, 100 °C, 3 h). Dabei werden Phosphodiesterbindungen unter gleichzeitiger Entstehung von Phosphomonoestern gespalten. Nach erfolgter Hydrolyse wurden die Proben an Dowex 50 [H⁺] neutralisiert und glycosidische Bindungen mit 1 M HCl (100 °C, 3 h) gespalten. Anschließend wurde jeweils die eine Hälfte der Proben mit wässriger Flußsäure behandelt. Der Nachweis von Glucosamin und möglicherweise entstandenem Glucosaminphosphat erfolgte am Aminosäurenanalysator. Als Standardsubstanzen dienten Glucosamin und Glucosamin-6-Phosphat.

In sämtlichen Proben, die nicht HF-behandelt wurden, konnte eine Ninhydrin-positive Komponente mit einer ähnlichen Retentionszeit wie Glucosamin-6-Phosphat nachgewiesen werden. Es handelte sich dabei um phosphoryliertes Glucosamin, das durch Behandlung mit HF in Glucosamin überzuführen war. Die prozentualen Anteile an Glucosamin und Glucosaminphosphat in den Teichonsäurehydrolysaten sind in Tabelle 19 angegeben. Der Anteil an phosphoryliertem Glucosamin lag je nach Teichonsäure zwischen 35 % und 60 %. Demnach liegen sowohl Ribit als auch N-Acetylglucosamin in den Teichonsäuren phosphoryliert vor und sind folglich an Phosphodiesterbindungen beteiligt. Es ist deshalb anzunehmen, daß es sich bei den untersuchten Teichonsäuren um Poly-(N-Acetylglucosaminytribitphosphat)-Ketten handelt, wobei N-Acetylglucosaminyreste mit Glucose und/oder Galactose substituiert sind. Damit konform gehen (1) das Vorliegen von Ribit, N-Acetylglucosamin und Phosphat in nahezu äquimolaren Verhältnissen sowie die glycosidische Anbindung von N-Acetylglucosamin am Ribit.

Tabelle 19:

Prozentuale Anteile von Glucosamin und Glucosaminphosphat nach HCl-Hydrolyse phosphorylierter Teichonsäurefragmente mit und ohne anschließender HF-Behandlung.

Phosphorylierte Teichon- säurefragmente aus: ^a	Behandlung	Prozentanteile von:	
		GlcN (%)	GlcN-P (%)
L. monocytogenes	Hyd ^b , HF ^c	100	--
SV 4b	Hyd ^b	65	35
L. innocua	Hyd ^b , HF ^c	100	--
SV 6a	Hyd ^b	63	37
L. innocua	Hyd ^b , HF ^c	100	--
SV 6b	Hyd ^b	40	60

^aDie phosphorylierten Teichonsäurefragmente wurden durch Hydrolyse mit 2 M NaOH (100 °C, 3 h) aus Teichonsäuren erhalten.

^bHydrolyse mit 1 M HCl (100 °C, 3 h)

^cBehandlung mit 60%iger wässriger HF (0 °C, 16 h)

3.2.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die erhaltenen Ergebnisse zur Struktur der Teichonsäuren aus *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b), *L. innocua* ATCC 33090 (SV 6a) und *L. innocua* ATCC 33091 (SV 6b) ermöglichen folgende Aussagen:

- (1) Die untersuchten Teichonsäuren bestehen alle aus einer Poly(N-Acetylglucosaminylribitphosphat)-Kette, wobei N-Acetylglucosamin als integraler Bestandteil der Kette β -glycosidisch an Ribit gebunden ist.
- (2) Galactose und/oder Glucose treten als Substituenten des N-Acetylglucosamins auf. Galactose ist dabei α -glycosi-

disch gebunden. Die sterische Konfiguration der Glucose wurde nicht aufgeklärt.

Die Teichonsäure aus *L. monocytogenes* SV 4b ist sowohl mit Galactose als auch Glucose substituiert, wobei Glucose mit dem C₃- oder C₄-Atom des N-Acetylglucosamins verknüpft ist.

Die Teichonsäuren aus *L. innocua* der Sero-varietäten 6a und 6b sind entweder nur mit Galactose (SV 6a) oder Glucose (SV 6b) substituiert. Beide Zucker sind an das C₃- oder C₄-Atom des N-Acetylglucosamins gebunden.

3.3 Untersuchungen zur Immunogenität von Lipoteichon- und Teichonsäuren verschiedener Listeria-Stämme

Lipoteichon- und Teichonsäuren sind immunogen und stellen als Komponenten der Zelloberfläche Gram-positiver Bakterien oftmals wichtige somatische Antigene dar (Knox und Wicken, 1973; Wicken und Knox, 1975). In diesem Zusammenhang sollten Lipoteichon- und Teichonsäuren von verschiedenen Vertretern der Gattung *Listeria* auf ihre Immunogenität und auf Kreuzreaktivität mit heterologen O-Anti-*Listeria*-Seren untersucht werden.

3.3.1 Agglutination von *L. innocua*-Zellen (ATCC 33090) mit Streptokokken-Gruppenserum

Lipoteichonsäuren wurden als Gruppenantigen bei Laktobazillen und Streptokokken nachgewiesen (Knox und Wicken, 1975). Im Falle von Streptokokken der Gruppe N stellen α -D-Galactopyranosylreste als Substituenten der Lipoteichonsäuren von Vertretern dieser Gruppe die antigenen Determinanten dar.

Listeria-Stämme, deren Teichonsäuren und/oder Lipoteichonsäuren ebenfalls mit α -D-Galactopyranose substituiert sind, sollten demnach mit Streptokokken-Gruppenserum N reagieren. Voraussetzung dafür ist, daß die Lipoteichonsäuren bzw. Teichonsäuren aufgrund ihrer Lokalisation an der Zelloberfläche für die Reaktion mit den Antikörpern des Serums zugänglich sind.

Zellen von *L. innocua* ATCC 33090 (SV 6a) wurden, wie unter 2.16.2 beschrieben, auf Agglutination mit käuflichem Streptokokken-Gruppenserum (Gruppe N, Fa. Wellcome) getestet. Als Kontrollen dienten Zellen von *Sc. lactis* NCDO 712 und *S. aureus* H.

Sc. lactis NCDO 712 besitzt eine Lipoteichonsäure vom Poly-(Glycerinphosphat)-Typ, wobei die Glycerinreste wie bei *Listeria*-Stämmen zum Teil mit α -D-Galactopyranose und D-Alanin substituiert sind (Fischer et al., 1980a). Im Fall von

S. aureus H tritt bei der Lipoteichonsäure nur D-Alanin, bei der Teichonsäure zusätzlich N-Acetylglucosamin als Substituent von Polyolresten auf (Duckworth et al., 1975; Baddiley et al., 1961 und 1962).

Die Ergebnisse der Agglutinationsversuche sind in Tabelle 20 zusammengefaßt.

Tabelle 20:

Ergebnisse der Agglutinationsversuche von Zellen der Stämme *L. innocua* ATCC 33090, *Sc. lactis* NCDO 712 und *S. aureus* H mit Streptokokken-Gruppenserum (Gruppe N).

Verdünnung des Serums	<i>L. innocua</i>	<i>Sc. lactis</i>	<i>S. aureus</i> H
1/2	+	+	-
1/4	+	+	-
1/8	+	+	-
1/16	(+)	(+)	-
1/32	(+)	-	-
1/64	-	-	-

+ : gute Agglutination

(+): mäßige Agglutination

- : keine Agglutination

Bei *L. innocua* konnte mit Serum, das 1:32 verdünnt worden war, noch Agglutination der Zellen beobachtet werden, während Zellen von *Sc. lactis* NCDO 712 bei einer Serumverdünnung von 1:16 gerade noch agglutinierten. *S. aureus* H-Zellen reagierten mit dem Streptokokken-Gruppenserum nicht. Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß die α -D-Galactopyranosyl-substituierte Lipoteichonsäure bzw. Teichonsäure

aus *L. innocua* für die Reaktion mit dem Streptokokken-Antiserum (Gruppe N) verantwortlich ist. Eine Agglutination von anderen *Listeria*-Stämmen mit diesem Serum ist demnach anzunehmen.

Die strukturelle Ähnlichkeit von Lipoteichonsäuren verschiedener Vertreter der Gattungen *Listeria* und *Streptococcus* könnte ein möglicher Grund für Kreuzreaktionen von Anti-*Listeria*-Seren mit Streptokokken sein (Seeliger und Höhne, 1979).

3.3.2 Immundoppeldiffusion von O-Anti-*Listeria*-Seren gegen Lipoteichon- und Teichonsäuren verschiedener *Listeria*-Stämme

Ziel der Untersuchungen war es, die Immunogenität von Lipoteichon- und Teichonsäuren in *Listeria*-Stämmen durch Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony (2.16.3) mit homologen und heterologen O-Anti-*Listeria*-Seren nachzuweisen. Zunächst wurde das Diffusionsverhalten von Lipoteichon- und Teichonsäuren in 1%igen Agarosegelen in Borat-gepufferter Saline auf Objektträgern bestimmt. Als Substrate dienten ^{14}C -markierte Polymere. Die Alanin-freie Lipoteichonsäure stammte aus *S. aureus* H. Eine radioaktiv markierte, Glucose-substituierte Poly(Glycerinphosphat)-Teichonsäure aus *Bacillus subtilis* DSM 10 und eine Poly(Ribitphosphat)-Teichonsäure aus *Bacillus subtilis* W 23 waren im Labor vorhanden. In die Agarosegele wurden Löcher mit 3,0 mm Durchmesser gestanzt. Getrocknete Proben der ^{14}C -markierten Polymere (10×10^3 cpm) wurden in 10 μl Borat-gepufferter Saline aufgenommen und in die Löcher pipettiert. Die Diffusion erfolgte bei RT für sechs Stunden in einer feuchten Kammer. Anschließend wurden von den Löchern ausgehend kleine Streifen mit einer Größe von 1,5 x 3,0 mm ausgeschnitten, diese getrocknet, in 0,2 ml H_2O bidest. aufgenommen und über Nacht bei RT inkubiert. Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte wie unter 2.17.7 beschrieben.

Die Verteilung der Lipoteichon- und Teichonsäuren bzw. der Radioaktivität in den Agarosegelen ist in Abbildung 20 A-C schematisch dargestellt.

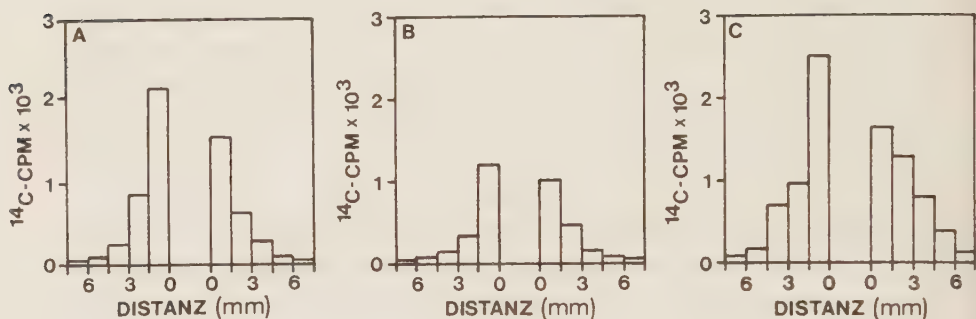


Abbildung 20 A-C:

Diffusionsverhalten von radioaktiv markierten Lipoteichon- und Teichonsäuren in 1%igen Agarosegelen auf Objektträgern.

A: Alanin-freie Lipoteichonsäure aus *S. aureus* H

B: Polyribitphosphat-Teichonsäure aus *Bacillus subtilis* W 23

C: Glucose-substituierte Poly(Glycerinphosphat)-Teichonsäure aus *Bacillus subtilis* DSM 10

Bei allen untersuchten Lipoteichon- bzw. Teichonsäuren konnte eine Diffusion in das Agarosegel nachgewiesen werden. Besonders gut diffundierten die dealanylierte Lipoteichonsäure von *S. aureus* H und die Teichonsäure von *B. subtilis* DSM 10 in den Agarosegelen. Nach diesen Ergebnissen schien der Ouchterlony-Immundiffusionstest für den Nachweis der Antigenität von Lipoteichon- oder Teichonsäuren geeignet zu sein.

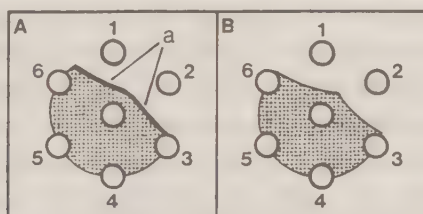
Immundiffusionsexperimente wurden deshalb mit verschiedenen O-Anti-*Listeria*-Seren und Lipoteichon- oder Teichonsäurepräparaten aus *Listeria*-Stämmen durchgeführt (2.16.3).

Die Proben mit Lipoteichon- bzw. Teichonsäuren enthielten jeweils 0,1-2,0 μmol Phosphat.

Eine schematische Darstellung des Ergebnisses der Immundoppeldiffusion von Lipoteichonsäuren aus *L. innocua* ATCC 33090 (SV 6a) und *L. ivanovii* ATCC 19119 (SV 5) gegen die homologen O-Antiseren dieser Stämme ist in Abbildung 21 A und B wiedergegeben.

Eine sehr gute Immunreaktion, erkennbar an sichtbaren Präzipitatlinien, ergab sich bei der Lipoteichonsäure aus *L. innocua* (Abbildung 21 A). Die eingesetzten Mengen von 1,0 und 2,0 μmol Phosphat entsprachen dabei ca. 250 und 500 μg Lipoteichonsäure.

Wurden die Agarosegele einer Proteinfärbung mit Coomassie unterzogen, so zeigte sich, daß Proteine des Serums offensichtlich nicht über die Präzipitationslinien hinaus diffundierten. Es ist deshalb anzunehmen, daß eine Antigen-Antikörper-Reaktion dort angezeigt ist, wo eine Hemmung der Diffusion von Serumproteinen zustande kommt.



Abbildungung 21 A u. B:

Immundoppeldiffusion von Lipoteichonsäuren aus *L. innocua* ATCC 33090 (A) und *L. ivanovii* ATCC 19119 (B) gegen die jeweils homologen O-Anti-Listeria-Seren (schematische Darstellung der Coomassie-gefärbten Agarosegele).

Lipoteichonsäure-Proben mit (1) 2,0, (2) 1,0, (3) 0,5, (4) 0,3, (5) 0,2 und (6) 0,1 μmol Phosphat wurden aufgetragen. Die Seren mit einem Titer von jeweils 256 befanden sich in den zentralen Löchern.

^asichtbare Präzipitationslinie

Unter dieser Annahme konnte durch Anfärben des Agarosegels mit Coomassie eine Immunreaktion der Lipoteichonsäure aus *L. ivanovii* mit homologem O-Antiserum indirekt sichtbar gemacht werden (Abbildung 21 B). Immunreaktionen konnten nicht nachgewiesen werden, wenn Lipoteichonsäureproben mit einem Phosphatgehalt unter 1 μ mol eingesetzt wurden.

In weiteren Immundoppeldiffusionsexperimenten wurde O-Anti-*Listeria*-Serum gegen *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b) mit der homologen Lipoteichon- und Teichonsäure sowie mit Lipoteichon- und Teichonsäuren anderer *Listeria*-Stämme getestet.

Wie aus Abbildung 22 A ersichtlich ist, reagierte das O-Antiserum gegen die Serovarietät 4b mit der homologen Lipoteichonsäure. Lipoteichonsäuren anderer *Listeria*-Stämme verursachten ebenfalls eine Immunreaktion mit diesem Serum (Abbildung 22 B). Dies war aufgrund der strukturellen Identität der Lipoteichonsäuren in der Gattung *Listeria*, mit Ausnahme von *L. grayi* und *L. murrayi*, zu erwarten (3.1).

Zu keiner nachweisbaren Antigen-Antikörper-Reaktion kam es bei der Immundoppeldiffusion von O-Anti-*Listeria*-Serum der Serovarietät 4b gegen die homologe Teichonsäure (Abbildung 22 A) und gegen Teichonsäuren aus anderen *Listeria*-Stämmen (Abbildung 22 C). Immundiffusionsexperimente mit weiteren O-Anti-*Listeria*-Seren und verschiedenen Teichonsäuren lieferten in keinem Fall sichtbare oder nachweisbare Immunreaktionen (ohne Abbildung). Aus diesen Resultaten sollte jedoch nicht abgeleitet werden, daß Teichonsäuren im Gegensatz zu Lipoteichonsäuren an der Zelloberfläche von *Listerien* nicht immunologisch wirksam sind. Vielmehr ist anzunehmen, daß der Immundoppeldiffusionstest nach Ouchterlony zum Nachweis der Immunogenität von Teichonsäuren ungeeignet ist. Teichonsäure-spezifische Antikörper konnten nämlich in O-Anti-*Listeria*-Seren durch quantitative Präzipitation von Teichonsäuren aus *L. monocytogenes* EGD und *L. ivanovii* ATCC 19119 nachgewiesen werden (Kamisango et al., 1983; Jochmus, 1986).



Abbildung 22 A-C:

Immundoppeldiffusion des O-Antiserums von *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b) gegen Lipoteichon- und Teichonsäuren verschiedener Vertreter der Gattung *Listeria*.

Das Serum mit einem Titer von 64 befand sich jeweils in den zentralen Löchern. Das Gel wurde mit Coomssie angefärbt.

- A: (1-3) Lipoteichonsäure aus *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b); (1) 0,5, (2) 1,0 und (3) 2,0 μmol Phosphat
 (4-6) Teichonsäure aus *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b); (4) 2,0, (5) 1,0 und (6) 0,5 μmol Phosphat
- B: (1,2) Lipoteichonsäure aus *L. ivanovii* ATCC 19119 (SV 5);
 (1) 1,0 und (2) 2,0 μmol Phosphat
 (3,4) Lipoteichonsäure aus *L. innocua* ATCC 33090 (SV 6a);
 (3) 1,0 und (4) 2,0 μmol Phosphat
 (5,6) Lipoteichonsäure aus *L. monocytogenes* ATCC 19111 (SV 1/2a); (5) 1,0 und (6) 2,0 μmol Phosphat
- C: (1,2) Teichonsäure aus *L. monocytogenes* ATCC 19113 (SV 3a); (1) 1,0 und (2) 2,0 μmol Phosphat
 (3,4) Teichonsäure aus *L. innocua* ATCC 33090 (SV 6a);
 (3) 1,0 und (4) 2,0 μmol Phosphat
 (5,6) Teichonsäure aus *L. innocua* ATCC 33091 (SV 6b);
 (5) 1,0 und (6) 2,0 μmol Phosphat

Die Resultate der Immundoppeldiffusion von Lipoteichonsäuren aus *L. monocytogenes* ATCC 19111, *L. monocytogenes* ATCC 19115, *L. murrayi*, *S. aureus* H und *Sc. lactis* NCDO 712 gegen O-Anti-Listeria-Seren werden in Abbildung 23 A und B gezeigt. Antikörper der Seren waren gegen die Stämme *L. monocytogenes* ATCC 19111 (SV 1/2a) und *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b) gerichtet.

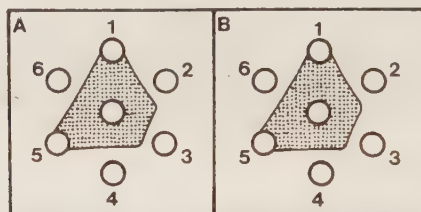


Abbildung 23 A u. B:

Immundoppeldiffusion von Lipoteichonsäuren aus (2) *L. monocytogenes* ATCC 19111, (3) *L. monocytogenes* ATCC 19115, (4) *S. aureus* H, (5) *L. murrayi* und (6) *Sc. lactis* NCDO 712 sowie (1) physiologischer NaCl-Lösung gegen O-Anti-Listeria-Seren (Schematische Darstellung des Coomassiegefärbten Agarosegels).

Die O-Antiseren gegen (A) *L. monocytogenes* ATCC 19111 (Titer: 128) und (B) *L. monocytogenes* ATCC 19115 (Titer: 64) befanden sich jeweils in den zentralen Löchern.

Eine gute Immunreaktion zeigten hierbei wiederum die Lipoteichonsäuren der *L. monocytogenes*-Stämme mit dem homologen oder heterologen Antiserum. Keine Reaktion mit den O-Antiseren war bei der Lipoteichonsäure von *L. murrayi* und der Kontrolle (physiologische NaCl-Lösung) zu sehen.

Die α -Galactosyl-substituierte Lipoteichonsäure aus *Sc. lactis* NCDO 712 (Fischer et al., 1980a) reagierte hingegen mit Antikörpern der Seren. Die α -Galactosylreste stellen demnach

die antigenen Epitope der Lipoteichonsäuren dar. Überraschenderweise ereigneten sich offensichtlich Antigen-Antikörper-Reaktionen im Fall der nicht α -Galactosyl-substituierten Lipoteichonsäure von *S. aureus* H (Duckworth et al., 1975) mit den O-Anti-Listeria-Seren. Dies ist möglicherweise auf die Anwesenheit von Antikörpern zurückzuführen, die gegen den Gentiobiosyl-Lipidanker gerichtet sind.

Antikörper, die spezifisch für die Poly(Glycerinphosphat)-Sequenz der Lipoteichonsäuren sind, enthielten die verwendeten O-Antiseren offensichtlich nicht, da sie mit der Lipoteichonsäure von *L. murrayi* nicht reagierten. Die D-Alanin-Substituenten der Lipoteichonsäuren spielen unter den hier angewendeten Bedingungen keine Rolle als antigene Determinanten, da sie bei einem pH-Wert nahe 8,0 schnell durch Hydrolyse abgespalten werden (Fischer und Rösl, 1980).

3.4 Untersuchung von *L. monocytogenes* ATCC 19115 auf Lipoteichon-, Teichon- und Teichuronsäure bei Kultivierung in einem synthetischen Medium (MOPSS_{suppl.}-Medium) unter Phosphatmangel

Teichuronsäure wurde zum ersten Mal von Janczura et al. (1961) aus *B. licheniformis* 6346 isoliert und als ein Polymer aus N-Acetylgalactosamin und D-Glucuronsäure charakterisiert. Ellwood und Tempest (1969) berichteten, daß Zellen von *B. subtilis* var. *niger* unter Phosphat-limitierten Bedingungen Teichuronsäuren synthetisieren. Wurden Zellen dieses Stammes in Chemostatkultur Phosphatmangelbedingungen ausgesetzt, so kam es zur Biosynthese von Teichuronsäure, während gleichzeitig die Teichonsäuresynthese eingestellt wurde (Tempest et al., 1968; Ellwood und Tempest, 1972). Das Vorhandensein von Lipoteichonsäure wurde von dem Phosphatgehalt des Mediums nicht beeinflusst. Unter diesen Aspekten sollte nun *L. monocytogenes* ATCC 19115 exemplarisch für die Gattung *Listeria* auf das Vorkommen und die Biochemie von sauren Polymeren der Zellwand und der Cytoplasmamembran bei Anzucht unter minimalen Phosphatkonzentrationen des Mediums untersucht werden.

3.4.1 Wachstum von *Listeria*-Stämmen auf synthetischem Medium (MOPSS_{suppl.}-Medium)

Für das Wachstum von *Listeria*-Stämmen unter limitierten Phosphatkonzentrationen war das komplex zusammengesetzte BHI-Medium ungeeignet. Es sollte deshalb ein synthetisches Medium, das Phosphat in variablen Konzentrationen enthält, hergestellt werden.

Siddiqui und Kahn (1982) verwendeten für die Anzucht von *Listeria*-Stämmen verschiedener Serovarietäten ein synthetisches Medium, das Glucose, verschiedene Mineralsalze, Vitamine, Nucleotide und Aminosäuren in Form eines Caseinhydrolysats enthielt.

In dieser Untersuchung wurde ein vollkommen definiertes Medium zusammengestellt. Die Grundlage bildete das MOPS-Minimalmedium nach Neidhardt et al. (1974), das eine Reihe von Mineralsalzen enthält. Diesem Medium wurden die natürlichen Aminosäuren der Proteine (100 µg/ml), Nucleoside (50 µg/ml) und Vitamine (0,1-10 µg/ml) zugesetzt (2.2). Die Glucose- und Phosphatkonzentration wurden variiert. Die Sterilisation des Mediums, im folgenden Text als MOPSS_{suppl.}-Medium bezeichnet, erfolgte durch Sterilfiltration mit Bakterien-dichten Filtern oder durch Autoklavieren.

Zunächst wurde das Wachstum von *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b) auf MOPSS_{suppl.}-Medium in Abhängigkeit des Phosphat- und Glucosegehalts untersucht. Kölbchen, die jeweils 30 ml sterilfiltriertes Medium mit unterschiedlichen Phosphat- und Glucosekonzentrationen enthielten, wurden mit der Impföse aus BHI-Flüssigkulturen beimpft und bei 37 °C unter Schütteln bebrütet. Als Maß für das Wachstum wurden nach 16 h Kultivierungszeit die optischen Dichten der Kulturen bei 578 nm bestimmt. Das Wachstum ist graphisch in Abbildung 24 dargestellt.

Bei einer Phosphatkonzentration unter 1 mM erfolgte kaum, über 2 mM relativ gutes Wachstum. In den Parallelansätzen mit 10 und 20 g Glucose pro 1 l Medium zeigten sich keine Unterschiede im Wachstum.

Das Wachstum von verschiedenen *Listeria*-Stämmen in autoklaviertem MOPSS_{suppl.}-Medium bei einer Phosphatkonzentration von 5 mM (20 g Glucose pro 1 l) wurde durch Messung der optischen Dichte bei 578 nm verfolgt, nachdem die Stämme zuvor jeweils zweimal hintereinander in MOPSS_{suppl.}-Medium angezogen worden waren. In Abbildung 25 A und B sind die Wachstumskurven von *Listeria*-Stämmen verschiedener Sero-varietäten auf MOPSS_{suppl.}-Medium wiedergegeben.

Relativ schlechtes Wachstum zeigten die Stämme *L. seeligeri* SLCC 3954 (SV 1/2b) und *L. ivanovii* ATCC 19119 (SV 5). Die übrigen Stämme erreichten optische Dichten bei 578 nm

von 0,35 bis 0,62 mit Generationszeiten von ca. 2 h. Bei Wachstum dieser Stämme auf BHI-Medium der Fa. Merck wurden zum Vergleich maximale optische Dichten von 1,0-1,4 mit Generationszeiten von ca. 1 h gemessen (*L. seeligeri* und *L. ivanovii* hingegen konnten nur in BHI-Medium der Fa. Oxoid, nicht jedoch in BHI-Medium der Fa. Merck kultiviert werden). Untersucht wurde außerdem das Wachstum der *Listeria*-Stämme über mehrere Passagen auf MOPS_{suppl.}-Agarplatten. Auch nach bis zu zehn Transfers wuchsen die Zellen, ausgenommen die Stämme *L. seeligeri* und *L. ivanovii*, noch innerhalb von zwei bis drei Tagen zu Kolonien heran. Damit wurde gezeigt, daß *Listerien* fortlaufend in MOPS_{suppl.}-Medium kultiviert werden können.

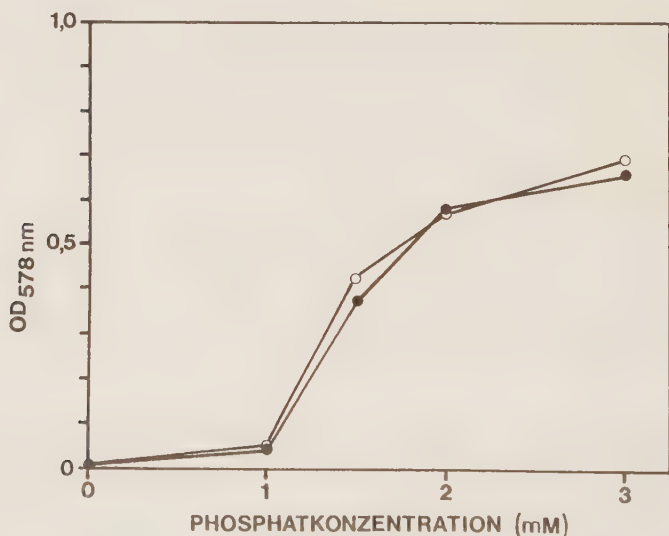
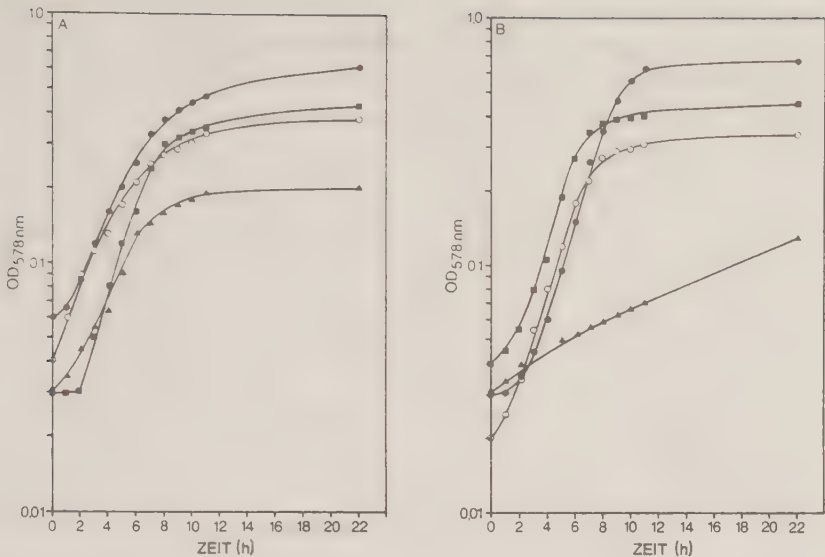


Abbildung 24:

Wachstum von *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b) auf MOPS_{suppl.}-Medium in Abhängigkeit der Phosphat- und Glucosekonzentration (10 g/l ○—○, 20 g/l ●—●).

Es wurden jeweils die optischen Dichten von Parallelkulturen bei 578 nm nach 16 h Wachstum gemessen.



Abbildungung 25 A u. B:

Wachstum verschiedener Stämme der Gattung *Listeria* auf MOPSSuppl.-Medium.

A: *L. monocytogenes* ATCC 19113 (●—●), *L. monocytogenes* ATCC 19115 (■—■), *L. monocytogenes* SLCC 5778 (○—○), *L. ivanovii* ATCC 19119 (▲—▲)

B: *L. innocua* ATCC 33090 (■—■), *L. innocua* ATCC 33091 (●—●), *L. welshimeri* SLCC 5334 (○—○), *L. seeligeri* SLCC 3954 (▲—▲)

3.4.2 Untersuchung von *L. monocytogenes* ATCC 19115 auf Teichuron- bzw. Teichonsäure bei Kultivierung in MOPSSuppl.-Medium unter Phosphatmangel

Tempest et al. (1968) verwendeten zur Induktion der Teichuronsäurebiosynthese in *B. subtilis* var. *niger* ein Medium mit 1,5 mM Phosphat. Bei dieser Phosphatkonzentration zeigte *L. monocytogenes* ATCC 19115 bereits inhiertes, aber noch ausreichendes Wachstum (Abbildungung 24).

Der zu untersuchende *Listeria*-Stamm wurde deshalb auf dem Phosphat-limitierten und autoklavierten MOPS_{suppl.}-Medium mit 1,5 mM K₂HPO₄ (20 g Glucose pro 1 l) in diskontinuierlicher Kultur angezogen. Tryptisch gereinigte Zellwände wurden präpariert und mit Glycin /HCl (0,025 M, pH 2,5) extrahiert. Teichuronsäuren, die wie Teichonsäuren über Phosphodiesterbindungen an C₆-Hydroxylgruppen der Muraminsäurereste des Peptidoglycans gebunden sind (Hase und Matsushima, 1977), sollten dabei gleichermaßen abgespalten werden. Zur weiteren Aufreinigung wurde der dialysierte Glycin/HCl-Extrakt an DEAE-Sephacel chromatographiert. Das Elutionsprofil, das sich aufgrund des Phosphatgehalts einzelner Fraktionen ergab, ist in Abbildung 26 dargestellt. Ein Phosphat enthaltender Gipfel eluierte bei ca. 0,4 M NaCl. Einzelne Gipfelfractionen wurden nach HF-Behandlung (60%ige wässrige HF, 0 °C, 16 h) und anschließender Hydrolyse mit 2 M HCl (100 °C, 3 h) gaschromatographisch analysiert.

Das Phosphat-haltige Material enthielt Glucose, Galactose, Glucosamin und Ribit in den Mengen, wie sie für die Teichonsäure dieses Stammes bereits bestimmt wurden (3.2). Der Teichonsäuregehalt von Zellen, die in dem Phosphat-limitierten MOPS_{suppl.}-Medium angezogen worden waren, entsprach in etwa dem von Zellen, die in BHI-Medium gewachsen waren (Daten nicht angegeben). Jede zweite Fraktion der Chromatographie an DEAE-Sephacel (Fraktion 2-100) wurde, wie unter 2.13.7 beschrieben, auf das Vorhandensein von Uronsäuren als Komponenten von Teichuronsäuren untersucht. Uronsäuren konnten jedoch in keiner Fraktion nachgewiesen werden.

Bei Anzucht von *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b) in Phosphat-limitiertem Medium kommt es demnach nicht zur Biosynthese von Teichuronsäuren unter gleichzeitiger Einstellung der Teichonsäuresynthese, wie dies für *B. subtilis* var. *niger* nachgewiesen wurde (Tempest et al., 1968; Ellwood und Tempest, 1969 und 1972).

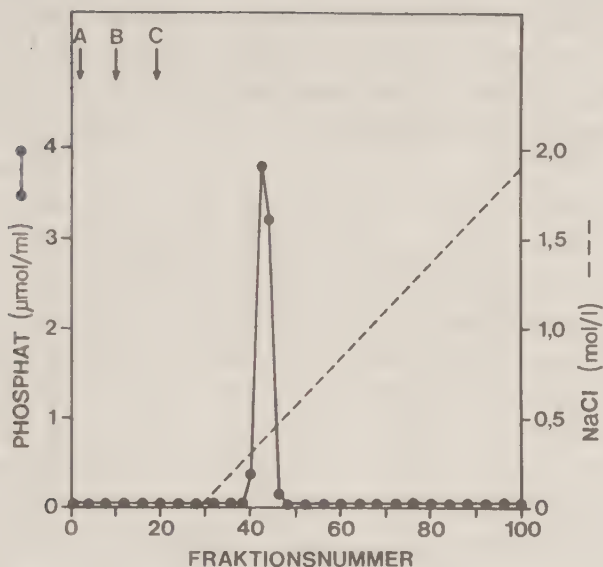


Abbildung 26:

Chromatographie des Glycin/HCl-extrahierten Materials aus Zellwänden von *L. monocytogenes* ATCC 19115 an DEAE-Sephacel. Die Zellwände stammten von 1 g naßen Zellen, die unter Phosphatmangel (1,5 mM) auf MOPS_{suppl.}-Medium angezogen wurden.

A: Auftragen der Probe

B: Elution mit 0,01 M Tris/HCl (pH 7,5)

C: Elution mit einem linearen Gradienten von 0-2 M NaCl in 0,01 M Tris/HCl (pH 7,5)

3.4.3 Untersuchung von *L. monocytogenes* ATCC 19115 auf Lipoteichonsäure bei Kultivierung in MOPS_{suppl.}-Medium unter Phosphatmangel

L. monocytogenes ATCC 19115 (SV 4b) wurde auf MOPS_{suppl.}-Medium bei einer Phosphatkonzentration von 1,5 mM (20 g Glucose pro 1 l) angezogen. Die Untersuchung auf Lipotei-

chonsäure erfolgte durch Phenol/Wasser-Extraktion aufgeschlossener Zellen (2.7) und anschließender Chromatographie an Octyl-Sepharose CL-4B (2.11.1.2).

Das Elutionsprofil der hydrophoben Chromatographie ist in Abbildung 27 wiedergegeben.

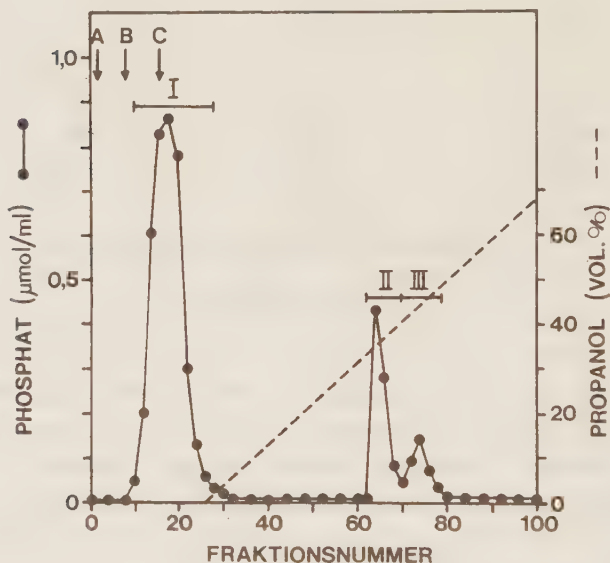


Abbildung 27:

Chromatographie des Phenol-extrahierten und dialysierten Materials aus *L. monocytogenes* ATCC 19115 an Octyl-Sepharose CL-4B.

Es wurde der Extrakt von 1 g naßen Zellen, die auf MOPSS_{suppl.}-Medium (1,5 mM Phosphat) angezogen worden waren, aufgetragen.

A: Auftragen der Probe

B: Elution mit 0,05 M Na-Acetat (pH 4,0)

C: Elution mit einem linearen Gradienten von Propanol (0-66%) in 0,05 M Na-Acetat (pH 4,0)

An Octyl-Sepharose bindendes Material eluierte in zwei Phosphat-haltigen Gipfeln (II und III), die gaschromatographisch näher charakterisiert wurden. Sämtliche Fraktionen enthielten Glycerin, Galactose und Glucose in den für die Lipoteichonsäure dieses Stammes zu erwartenden Molverhältnissen (3.1).

L. monocytogenes ATCC 19115 synthetisiert offensichtlich auch unter Phosphatmangelbedingungen Lipoteichonsäure. Die Auftrennung in zwei Gipfel wurde nicht näher untersucht. Es ist jedoch anzunehmen, daß hier durch die Präparation von sehr geringen Mengen Lipoteichonsäure eine Aufspaltung in Phosphatidyl- und nicht Phosphatidyl-substituierte Moleküle zu erkennen ist (3.1).

Die Ausbeute an Lipoteichonsäure, ausgedrückt in Phosphat, lag mit 12 μmol Phosphat pro 1 g nasse Zellen nur geringfügig unter dem Wert, der bei Anzucht dieses Stammes auf BHI-Medium erhalten wurde (13,8 μmol Phosphat pro 1 g nasse Zellen).

3.5 Untersuchung von *Listeria*-Stämmen auf das Vorkommen von Lipopolysacchariden

Verschiedene Autoren postulierten in der Vergangenheit das Vorkommen eines "Endotoxin-ähnlichen Materials" in Stämmen von *L. monocytogenes*.

Wexler und Oppenheim (1979 und 1980) präparierten durch Phenol/Wasser-Extraktion ein "*Listeria*-LPS" aus *L. monocytogenes* der Serovarietät 4b. Das isolierte Material enthielt die typischen "LPS-Marker" KDO, Heptose und β -Hydroxymyristinsäure und zeigte eine positive Reaktion im Limulus-Lysat-Test. Einen Lipopeptidopolysaccharidkomplex isolierten Mara et al. (1980) aus *L. monocytogenes*. Material, das biochemische Merkmale und biologische Aktivitäten wie Lipopolysaccharide aus Gram-negativen Bakterien aufwies, wurde von Singh et al. (1981) durch Phenolextraktion aus Zellen eines *Listeria*-Stammes der Serovarietät 4b präpariert.

Lipoteichonsäuren, ebenso amphiphile Polymere wie Lipopolysaccharide, wurden von den Autoren in den Phenol/Wasser-Extrakten ganzer *Listeria*-Zellen ungewöhnlicherweise nicht entdeckt. Bei der Reinigung von Lipoteichonsäuren verschiedener *Listeria*-Stämme durch Phenol/Wasser-Extraktion von Zellen und anschließende hydrophobe Chromatographie an Octyl-Sepharose traten andererseits keine Lipopolysaccharid-typischen Komponenten auf (3.1). Dies steht unter der Annahme, daß durch Phenol/Wasser-extrahierbare Lipopolysaccharide aufgrund ihrer amphiphilen Eigenschaften an Octyl-Sepharose binden sollten, im Widerspruch zum angeblichen Vorkommen dieser Polymere bei *L. monocytogenes*. Es sollten deshalb verschiedene *Listeria*-Stämme auf das Vorhandensein von Lipopolysacchariden näher untersucht werden.

Zunächst wurde versucht durch Phenol/Wasser-extrahierte Lipopolysaccharide aus Gram-negativen Bakterien über hydrophobe Chromatographie an Octyl-Sepharose zu reinigen. Aufwendige und unspezifische Reinigungsmethoden mit Hilfe von Nucleaseverdau und Gelfiltrationen sollten dabei unter

gleichzeitiger Gewinnung von reinen Präparaten umgangen werden.

3.5.1 Präparation von Lipopolysacchariden durch Phenol-extraktion und hydrophobe Chromatographie an Octyl-Sepharose

Für die Präparation von Lipopolysacchariden wurden die Stämme *Salmonella minnesota* SF III und *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 verwendet.

Die Lipopolysaccharide wurden aus ganzen Zellen, wie unter 2.8 beschrieben, mit wässrigem Phenol extrahiert. Die nach Phasentrennung erhaltenen wässrigen Überstände wurden entnommen und gegen Tris/HCl-Puffer (0,01 M, 1 M NaCl, pH 7,0) dialysiert. Die weitere Reinigung der Lipopolysaccharide erfolgte durch Chromatographie an Octyl-Sepharose Cl-4B. Bei einem ersten Versuch wurde der Tris/HCl-gepufferte LPS-Rohextrakt aus *Salmonella minnesota* SF III direkt auf die Octyl-Sepharose-Säule gepumpt. Nach kurzem Nachwaschen mit Puffer wurde mit einem Propanolgradienten von 0-66 Vol.% eluiert. Einzelne Fraktionen wurden gesammelt und auf Neutralzucker und Phosphat getestet. Die Chromatographiebedingungen und das Elutionsprofil sind in Abbildung 28 dargestellt.

Es ergaben sich drei Gipfel, wobei Gipfel I nicht-bindendes Material (z. B. Nucleinsäuren) enthielt. Gipfel II wurde nicht näher untersucht. Gipfel III, der bei einer Propanolkonzentration von ca. 37 % eluierte, wurde auf KDO getestet. Der Gesamtgehalt an KDO in Fraktionen von Gipfel III betrug etwa 4 μ mol. Außerdem konnten am Gaschromatographen nach Hydrolyse mit 2 M HCl (100 °C, 3 h) Galactose, Glucose, Galactosamin, Glucosamin und Heptose als typische Komponenten des Lipopolysaccharids aus *Salmonella minnesota* nachgewiesen werden (Lüderitz et al., 1966).

Unter der Voraussetzung, daß pro Lipopolysaccharidmolekül drei KDO-Reste vorhanden sind und das Molekulargewicht des

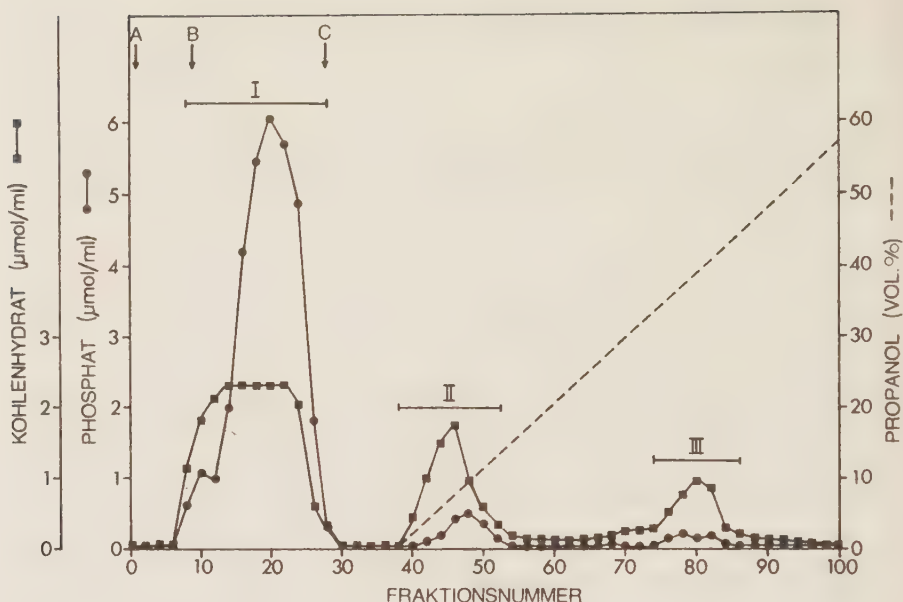


Abbildung 28:

Chromatographie des Phenol-extrahierten und dialysierten Materials aus *Salmonella minnesota* SF III an Octyl-Sepharose CL-4B.

Der Extrakt von ca. 25 g naßen Zellen wurde auf das Gel aufgetragen.

A: Aufpumpen der Probe

B: Elution mit 0,01 M Tris/HCl (pH 7,0, 1 M NaCl)

C: Elution mit einem linearen Gradienten von Propanol (0-66 %, v/v) in 0,01 M Tris/HCl (pH 7,0, 1 M NaCl)

Lipopolysaccharids aus *Salmonella minnesota* SF III ca. 23 kD beträgt, wurde der Gesamtgehalt an LPS in Gipfel III auf ungefähr 30 µg geschätzt. Diese Ausbeute an Lipopolysaccharid ist für 25 g nasse Zellen als Ausgangsmaterial der Präparation jedoch zu gering.

Es stellte sich die Frage, ob das Lipopolysaccharid unter den gewählten Chromatographiebedingungen quantitativ an

Octyl-Sepharose bindet. Op den Camp et al. (1984) fanden, daß ein amphiphiles Polymer aus *Bifidobacterium bifidum*, das einen hohen Zuckeranteil aufweist, nur in geringem Maße mit dem Gel interagiert. Fischer et al. (1983) führten die zum Teil ungenügende Bindung von Lipoteichonsäuren an Octyl-Sepharose auf eine Wechselwirkung mit kontaminierenden Proteinen zurück, die durch Zugabe von Propanol (15 Vol.%) zu den Lipoteichonsäure-Rohextrakten vor dem Auftragen auf die Säule aufgehoben werden konnte.

Die Fraktionen des nicht an Octyl-Sepharose bindenden Materials aus Abbildung 28 (Gipfel I) wurden deshalb vereinigt, mit Propanol bis zu einer Endkonzentration von 15 % (v/v) versetzt und erneut an Octyl-Sepharose chromatographiert. Nach dem Aufpumpen der Probe auf die Säule erfolgte die Elution mit einem Propanolgradienten von 15-80 Vol.%. Das Elutionsprofil ist in Abbildung 29 wiedergegeben.

Es ergab sich wiederum eine Auftrennung in zwei Gipfel, wobei bindendes Material (Gipfel II) bei einer Propanolkonzentration von ca. 37 % eluiert wurde. Die Chromatographie von Proben in 15 Vol.% Propanol brachte demnach eine erhebliche Steigerung der Ausbeute an Lipopolysaccharid.

Ein ähnliches Elutionsprofil wurde bei der Präparation des Lipopolysaccharids aus *Pseudomonas aeruginosa* auf diese Weise erhalten (ohne Abbildung).

In Sammelfractionen von Gipfel II wurden jeweils der Phosphat-, Neutralzucker- und KDO-Gehalt bestimmt. Wie aus Tabelle 21 ersichtlich ist, enthielten die LPS-Präparate der untersuchten Stämme KDO, in molaren Verhältnissen zu Phosphat von 0,05 bis 0,45.

Eine weitere Charakterisierung der isolierten Lipopolysaccharide erfolgte nach Hydrolyse mit 60%iger wässriger HF (0 °C, 16 h) und 2 M HCl (100 °C, 3 h) am Gaschromatographen und Aminosäurenanalysator. Die Ergebnisse sind in Tabelle 22 zusammengefaßt. In allen Fällen konnten für das jeweilige Lipopolysaccharid typische Komponenten nachgewiesen werden, dazu gehörten neben anderen Ethanolamin, Ethanolaminphosphat

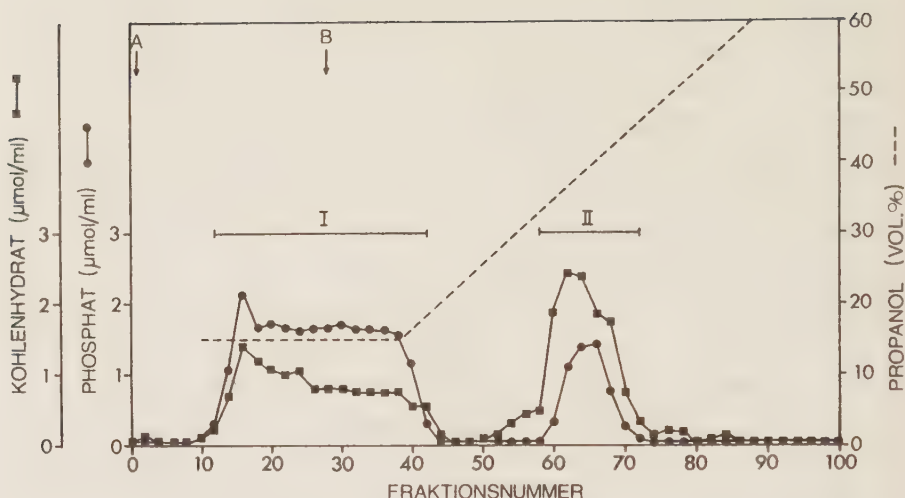


Abbildung 29:

Chromatographie der vereinigten Fraktionen von Gipfel I (Abbildung 28) an Octyl-Sepharose CL-4B.

A: Aufpumpen der Probe (15 % Propanol, v/v)

B: Elution mit einem linearen Gradienten von Propanol (15-80 %, v/v) in 0,01 M Tris/HCl (pH 7,0, 1 M NaCl)

Tabelle 21:

Molare Verhältnisse von Neutralzuckern und KDO zu Phosphat (=1,00) in den über Chromatographie an Octyl-Sepharose CL-4B gereinigten Lipopolysacchariden.

Stamm	Molverhältnisse zu Phosphat	
	(Phosphat=1,0)	
	Neutralzucker	KDO
Salmonella minnesota SF III	1,78	0,45
Pseudomonas aeruginosa	1,22	0,05

und Heptose (Lüderitz et al., 1966; Wilkinson und Galbraith, 1975). Fettsäuren wurden nach Verseifung der Lipopolysaccharide gaschromatographisch nachgewiesen, jedoch nicht identifiziert.

Nach Totalhydrolyse des LPS-Präparats von *Salmonella minnesota* SF III mit 4 M HCl (100 °C, 16 h) konnten keine Aminosäuren am Aminosäurenanalysator nachgewiesen werden. Demnach handelte es sich um ein reines Präparat, das nicht mit Proteinen verunreinigt war.

Tabelle 22:

Am Aminosäurenanalysator und Gaschromatographen identifizierte Komponenten in den über Chromatographie an Octyl-Sepharose CL-4B gereinigten Lipopolysacchariden.

Unterstrichene Komponenten waren in größeren Mengen vorhanden.

Stamm	Identifizierte Komponenten am:	
	ASA ^a	GC ^b
<i>Salmonella minnesota</i> SF III	<u>GalN</u> , <u>GlcN</u> , Ethanolamin, Ethanolamin-P	<u>GalN</u> , <u>GlcN</u> , <u>Gal</u> , Glc, X ^c
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	n.b. ^d	<u>Rha</u> , Rib, Glc, GlcN, X ^c

^aDie Proben wurden nach Hydrolyse mit 4 M HCl (100 °C, 16 h) am Aminosäurenanalysator untersucht.

^bDie Proben wurden nach Behandlung mit 60%iger wässriger HF (0 °C, 16 h) und Hydrolyse mit 2 M HCl (100 °C, 3 h) am Gaschromatographen analysiert.

^cKomponente, deren Retentionszeit der von Glucoheptose entspricht

^dnicht bestimmt

3.5.2 Versuch der Präparation von Lipopolysacchariden aus Listeria-Stämmen mit Hilfe der Chromatographie an Octyl-Sepharose

Die Stämme *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b) und *L. innocua* ATCC 33090 (SV 6a) wurden nach vorher dargestellter Methode (3.5.1) auf das Vorkommen von Lipopolysacchariden untersucht. Die dialysierten Phenolextrakte ganzer, hitzeabgetöteter Zellen wurden mit Propanol bis zu einer Endkonzentration von 15 Vol.% versetzt und anschließend an Octyl-Sepharose CL-4B chromatographiert. Die Bestimmung des Phosphat- und Neutralzuckergehalts einzelner Fraktionen lieferten die für *L. monocytogenes* SV 4b in Abbildung 30 und für *L. innocua* SV 6a in Abbildung 31 dargestellten Elutionsprofile.

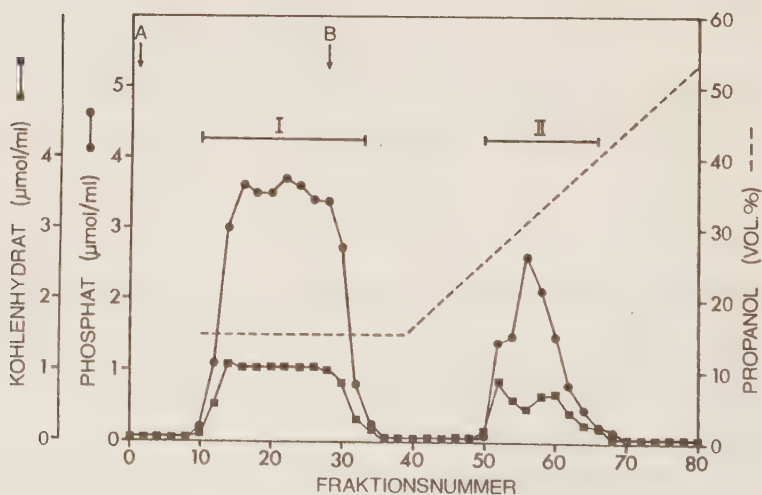


Abbildung 30:

Chromatographie des Phenol-extrahierten und dialysierten Materials aus *L. monocytogenes* SV 4b an Octyl-Sepharose CL-4B (Elutionsverfahren siehe Abbildung 29).

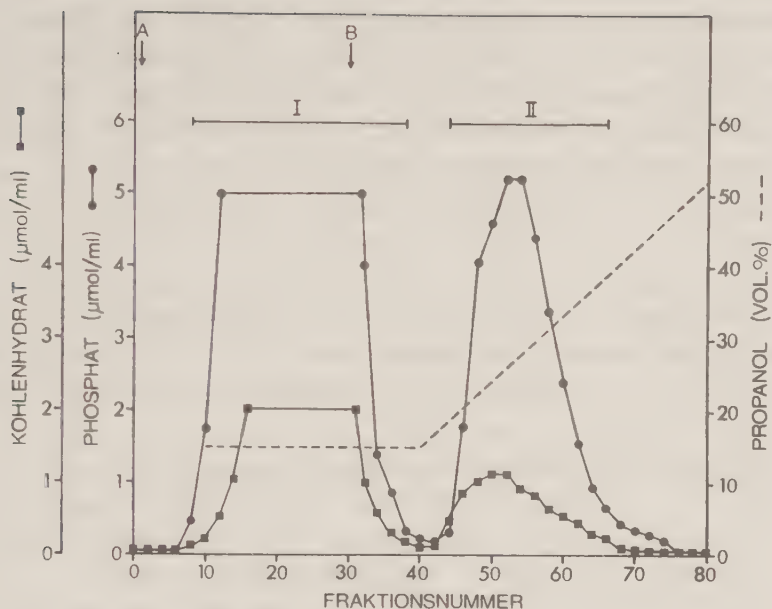


Abbildung 31:

Chromatographie des Phenol-extrahierten und dialysierten Materials aus *L. innocua* SV 6a an Octyl-Sepharose CL-4B (Elutionsverfahren siehe Abbildung 29).

In beiden Fällen ergab sich eine Aufspaltung in zwei Gipfel, wobei an Octyl-Sepharose bindendes Material (Gipfel II) bei einer Propanolkonzentration von ca. 30 % von der Säule abgelöst wurde. In einem weiteren Ansatz wurden Phenol-extrakte aus Formalin-abgetöteten Zellen von *L. monocytogenes* SV 4b in gleicher Weise an Octyl-Sepharose aufgetrennt. Es sollte dadurch ein möglicher Verlust von Lipopolysacchariden durch die Hitzebehandlung der Zellen ausgeschlossen werden. Das Elutionsverhalten entsprach dabei dem, von Phenol-extrakten hitzebehandelter Zellen (ohne Abbildung). Als zusätzliche Kontrolle wurden Phenol/Wasser-Extrakte von *S. aureus* H-Zellen an Octyl-Sepharose chromatographiert.

Fraktionen, die an das Gel bindende Substanzen enthielten (Gipfel II), wurden jeweils vereinigt und der Phosphat-, Neutralzucker- und KDO-Gehalt bestimmt. Danach enthielten sämtliche Sammelfraktionen, einschließlich derer von *S. aureus* H, geringe Mengen an "KDO" bzw. im Thiobarbitursäuretest positiv reagierende Substanzen (Tabelle 23).

Tabelle 23:

Molare Verhältnisse von Neutralzuckern und "KDO" zu Phosphat (=1,00) in den über Chromatographie an Octyl-Sepharose CL-4B gereinigten Substanzen aus *L. monocytogenes* SV 4b, *L. innocua* SV 6a und *S. aureus* H.

Stamm	Molverhältnisse zu Phosphat (Phosphat=1,00)	
	Neutralzucker	"KDO" ^a
<i>L. monocytogenes</i> SV 4b (hitzebehandelt)	0,227	0,006
<i>L. monocytogenes</i> SV 4b (Formalin-behandelt)	0,227	0,006
<i>L. innocua</i> SV 6a (hitzebehandelt)	0,210	0,009
<i>S. aureus</i> H	0,064	0,006

^a Im KDO-Nachweistest positiv reagierende Substanzen

Die molaren Verhältnisse von "KDO" zu Phosphat lagen zwischen 0,006 und 0,009 und damit weit unter den Werten, die für die LPS-Präparate der Gram-negativen Bakterien bestimmt wurden. Präparationen von erhitzten bzw. Formalin-behandelten Zellen unterschieden sich in ihrem "KDO"-Gehalt nicht. Ein Verlust von Lipopolysacchariden bei den untersuchten *Listeria*-Stämmen durch Erhitzen der Kulturen ist deshalb nicht anzunehmen. Der Nachweis von geringen Mengen

"KDO" in den "LPS-Präparaten" aus *Listeria*-Stämmen ist vermutlich auf unspezifische Reaktionen im KDO-Nachweistest zurückzuführen. Dies wird durch die positive Reaktion des Kontrollpräparats aus *S. aureus* H bestätigt.

Die "LPS-Präparate" von *L. monocytogenes* SV 4b und *L. innocua* SV 6a wurden nach Hydrolyse mit 4 M HCl (100 °C, 16 h) am Aminosäurenanalysator und nach Hydrolyse mit 60%iger wässriger HF (0 °C, 16 h) sowie 2 M HCl (100 °C, 3 h) am Gaschromatographen analysiert (Tabelle 24).

Es konnten Alanin, Glycerin, Galactose und Glucose nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich ausschließlich um Komponenten der Lipoteichonsäuren dieser Stämme (3.1).

Tabelle 24:

Am Aminosäurenanalysator und Gaschromatographen identifizierte Komponenten in den über Chromatographie an Octyl-Sepharose CL-4B gereinigten Substanzen von *L. monocytogenes* SV 4b und *L. innocua* SV 6a.

Stamm	Identifizierte Komponenten am:	
	ASA ^a	GC ^b
<i>L. monocytogenes</i> SV 4b (hitzebehandelt)	Alanin	Gro, Gal, Glc
<i>L. monocytogenes</i> SV 4b (Formalin-behandelt)	Alanin	Gro, Gal, Glc
<i>L. innocua</i> SV 6a (hitzebehandelt)	Alanin	Gro, Gal, Glc

^aDie Proben wurden nach Hydrolyse mit 4 M HCl (100 °C, 16 h) am Aminosäurenanalysator untersucht.

^bDie Proben wurden nach Behandlung mit 60%iger wässriger HF (0 °C, 16 h) und Hydrolyse mit 2 M HCl (100 °C, 3 h) am Gaschromatographen analysiert.

Nach den erhaltenen Ergebnissen konnten durch Phenolextraktion ganzer Zellen der untersuchten *Listeria*-Stämme und anschließende Chromatographie an Octyl-Sepharose keine LPS-ähnlichen Substanzen isoliert werden, obwohl diese neue Methode der Erfassung von Lipopolysacchariden bei Gram-negativen Bakterien eindeutige Ergebnisse lieferte. Diese Daten stehen demnach im Widerspruch zu den Aussagen von Wexler und Oppenheim (1979 und 1980).

3.5.3 Nachweis von Lipopolysacchariden durch SDS-PAGE

Das mit Hilfe der Chromatographie an Octyl-Sepharose gereinigte Lipopolysaccharid aus *Salmonella minnesota* SF III wurde durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nachgewiesen. Die Auftrennung erfolgte nach Peterson und McGroarty (1985) an einem Trenngel mit 0,1 % SDS und 15 % Acrylamid, wie unter 2.12.1.2 beschrieben. Proben zwischen 5 und 20 µg LPS (7,5-30 nmol Neutralzuckergehalt) wurden auf das Gel aufgetragen. Nach Anfärbung mit Periodat-Silber konnte das für Lipopolysaccharide typische Bandenmuster (Leiter) nachgewiesen werden (Abbildung 32).

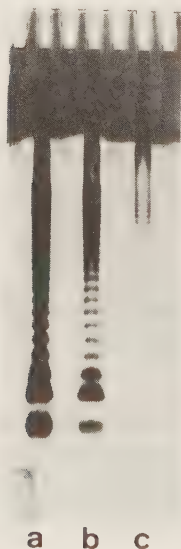


Abbildung 32:

SDS-PAGE des Lipopolysaccharids aus *Salmonella minnesota* SF III.

Proben mit 20 µg (a), 10 µg (b) und 5 µg (c) wurden auf das Gel aufgetragen, wobei 10 µg LPS einem Neutralzuckergehalt von 15 nmol entsprachen. Das Gel (15 % Acrylamid) wurde mit Periodat-Silber gefärbt.

Die einzelnen Banden entsprechen dabei Lipopolysaccharidmolekülen mit unterschiedlich langen O-antigenen Seitenketten. Die "LPS-Präparate" der erhitzten bzw. Formalin-behandelten Zellen von *L. monocytogenes* SV 4b wurden ebenso durch SDS-PAGE analysiert (ohne Abbildung). Obwohl Proben mit einem fünf- bis zehnfachen Neutralzuckergehalt im Vergleich zu *Salmonella minnesota* SF III (Abbildung 32) gelchromatographisch aufgetrennt wurden, konnte kein mit Periodat-Silber anfärbbares Bandenmuster entdeckt werden.

3.6 Untersuchung von Listeria-Stämmen auf Zelloberflächenproteine

Auf der Suche nach spezifischen Oberflächenantigenen in der Gattung *Listeria* sollten Proteine der Zellhülle bei *Listeria*-Stämmen verschiedener Serovarietäten nachgewiesen und verglichen werden.

Als mögliche Oberflächenproteine kommen dabei Strukturproteine, autolytische Enzyme und mit der Zellwand assoziierte Exoproteine in Frage.

3.6.1 Untersuchung der Zellwand von *L. monocytogenes* ATCC 19115 auf kovalent gebundene Proteine

Von *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b) wurden, wie unter 2.5 beschrieben, Rohzellwände präpariert, diese mehrmals mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und darauffolgend zweimal mit SDS extrahiert, um nicht-kovalent gebundene Proteine zu entfernen. Die SDS-behandelten Zellwände wurden lyophilisiert und einer Totalhydrolyse mit 4 M HCl (100 °C, 16 h) unterzogen. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung am Aminosäurenanalysator.

Mit Ausnahme der für das Peptidoglycan von Listerien typischen Aminosäuren konnten keine weiteren Aminosäuren nachgewiesen werden. Damit wurde gezeigt, daß im Fall von *L. monocytogenes* ATCC 19115 keine mit dem Peptidoglycan kovalent verknüpften Proteine vorliegen.

3.6.2 Untersuchung von SDS-extrahierten Proteinen aus Zellen durch PAGE

Auf BHI-Medium angezogene und durch Hitze abgetötete Zellen von *L. monocytogenes* ATCC 19111 (SV 1/2a) und *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b) wurden intensiv mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen.

Für die Extraktion von Proteinen wurden jeweils 50 mg

feuchte Zellen in 100 µl SDS-PAGE-Probenpuffer (2.12.1.1), der 2 % oder 4 % (w/v) SDS enthielt, suspendiert und die Ansätze für 5 min (2 % SDS), bzw. 30 min (4 % SDS) gekocht. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert und der 10 mg Zellen entsprechende Überstand durch SDS-PAGE aufgetrennt (2.12.1.1).

Ein Photo des SDS-Polyacrylamidgels nach Anfärbung mit Coomassie ist in Abbildung 33 gezeigt.

Wie zu erkennen ist, unterscheiden sich die Proteinbandenmuster beider Stämme nur geringfügig. Die Extraktionen mit 2 % SDS (100 °C, 5 min) und mit 4 % SDS (100 °C, 30 min)



Abbildung 33:

SDS-PAGE der Extrakte ganzer Zellen von *L. monocytogenes*-Stämmen mit 2 % SDS für 5 min (b und c) und mit 4 % SDS für 30 min (e und f) bei 100 °C (Coomassie-gefärbtes Gel).

(a) und (d), Molekulargewichtsstandard (26,6 - 180 kD);

(b) und (e), *L. monocytogenes* ATCC 19111;

(c) und (f), *L. monocytogenes* ATCC 19115

lieferten keine Unterschiede in der Intensität und Zusammensetzung der Bandenmuster.

Das durch die SDS-Extraktion der Zellen erhaltene Proteinprofil entsprach in etwa dem Gesamtzellproteinmuster dieser Stämme (Lamont et al., 1986). Durch die SDS-Behandlung der Zellen wurden demnach auch Proteine des Cytoplasmas und der Zellmembran extrahiert, so daß die Vielzahl der durch SDS-PAGE erhaltenen Banden in ihrer Gesamtheit sicherlich nicht Oberflächenproteinen entsprechen.

3.6.3 Vergleich der Proteinmuster von Rohzellwänden und Zellmembranen durch SDS-PAGE

Rohzellwände und Zellmembranen wurden von *L. monocytogenes* ATCC 19115, wie unter 2.5 beschrieben, präpariert. Jeweils 1 mg der lyophilisierten Zellwände und Membranen wurden in SDS-PAGE-Probenpuffer für 3 min gekocht, anschließend auf SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen und die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Ein Photo des Coomassiegefärbten Gels ist in Abbildung 34 wiedergegeben.

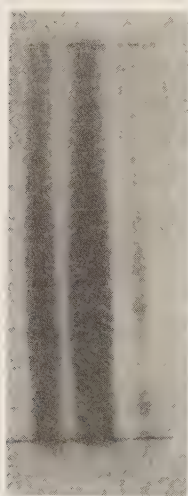


Abbildung 34:

SDS-PAGE der Rohzellwände (a) und Zellmembranen (b) von *L. monocytogenes* ATCC 19115.

Ein Molekulargewichtsstandard (26,6-180 kD) ist in Spur c aufgetragen. Die Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie sichtbar gemacht.

a b c

Sowohl die Zellmembranen als auch die Rohzellwände lieferten eine Vielzahl von Banden, wobei sich das Proteinmuster der Zellwände kaum von dem der Zellmembranen unterschied.

Das "Schmieren" der Proteine von Rohzellwänden und Zellmembranen ist auf die Anwesenheit von Lipiden zurückzuführen.

Es ist daher anzunehmen, daß auf diese Weise präparierte Zellwände mit Membranresten verunreinigt sind und sich deshalb nicht für die Identifizierung von spezifischen Oberflächenproteinen eignen.

3.7 Untersuchung von Listeria-Stämmen auf Exoproteine

Die Ziele der Untersuchungen waren , (1) Exoproteine bei verschiedenen *Listeria*-Stämmen zu isolieren, (2) möglicherweise Serovarietäten-spezifische Proteine zu identifizieren und (3) ihre Lokalisation an der Zelloberfläche durch Immunoblotting mit O-Anti-*Listeria*-Serum nachzuweisen.

Wie unter 2.9 beschrieben, erfolgte die Präparation der Exoproteine mit Hilfe von drei unterschiedlichen Methoden. Das allen gemeinsam zugrunde gelegte Prinzip ist, hochmolekulare, bei der Präparation störende Substanzen (z. B. Polypeptide) des BHI-Mediums zu entfernen bzw. von den Bakterienkulturen fernzuhalten.

3.7.1 Präparation der Exoproteine von Kulturen auf festem Nährboden

Zunächst wurden verschiedene *Listeria*-Stämme bei Anzucht auf Dialysemembran-bedeckten BHI-Agarplatten auf extrazelluläre Proteine untersucht (2.9.1). Die Dialysemembranen verhinderten eine Diffusion der Exoproteine in den Agar. Nach Abspülen der bewachsenen Seiten der Membranen mit physiologischer NaCl-Lösung wurden die Zellen sedimentiert, die erhaltenen Überstände dialysiert und für die Auftrennung in SDS-Polyacrylamidgelen aufbereitet (2.12.1.1). Eine nicht beimpfte, Dialysemembran-bedeckte BHI-Agarplatte diente als Kontrolle.

Das Ergebnis der SDS-PAGE nach Anfärbung des Gels mit Coomassie ist für die Stämme *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b), *L. monocytogenes* SLCC 5778 (SV 4b) und *L. welshimeri* SLCC 5334 (SV 6a) in Abbildung 35 dargestellt.

Keine Polypeptidbanden konnten bei der Kontrolle und bei *L. monocytogenes* SLCC 5778, einem avirulenten und Hämolyisin-negativen Vakzine-Stamm ("rough strain"), nachgewiesen werden.

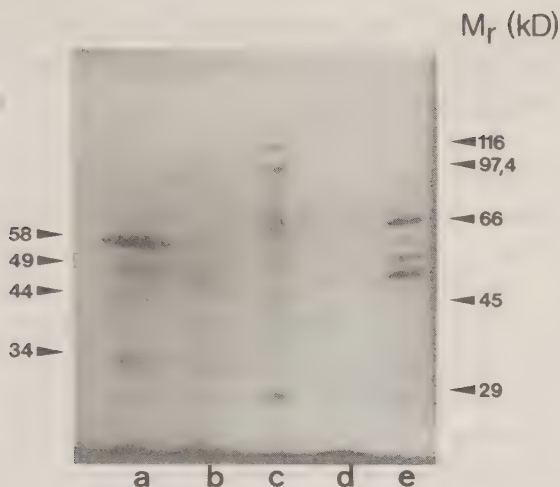


Abbildung 35:

SDS-PAGE zum Nachweis von Exoproteinen verschiedener *Listeria*-Stämme, die auf Dialysemembran-bedeckten BHI-Agarplatten kultiviert wurden.

(a), *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b);

(b), *L. monocytogenes* SLCC 5778 (SV 4b);

(c), Molekulargewichtsstandard;

(d), Kontrolle;

(e), *L. welshimeri* SLCC 5334 (SV 6a)

^aMr = apparentes Molekulargewicht

Das Exoproteinmuster von *L. monocytogenes* ATCC 19115 setzt sich aus einer sehr prominenten Proteinbande im Bereich von 58 kD und drei weiteren, weniger intensiv angefärbten Banden, die Molekulargewichten von ca. 49, 44 und 34 kD entsprechen, zusammen.

Ebenfalls vier verschiedene Exoproteine mit ungefähren Molekulargewichten von 65, 51, 48 und 31 kD wurden für *L. welshimeri* nachgewiesen.

3.7.2 Präparation der Exoproteine von Flüssigkulturen in Dialyseschläuchen zur Erstellung einer Kinetik der Exoproteinproduktion

Es sollte die Abhängigkeit der Exoproteinproduktion von der Wachstumsphase diskontinuierlicher *Listeria*-Kulturen untersucht werden.

Zunächst wurden die Organismen direkt in BHI-Medium angezogen. Der durch Sedimentation der Zellen erhaltene Kulturüberstand wurde bakterienfrei filtriert und durch Ultrafiltration eingeeengt. Dabei kam es zur Anreicherung von höher-molekularen Bestandteilen des Mediums, die durch mehrmaliges Ultrafiltrieren nicht entfernt werden konnten und die sich auf den Nachweis von Exoproteinen durch SDS-PAGE äußerst störend auswirkten. Obwohl die Proteine vor der Elektrophorese mit Trichloressigsäure präzipitiert wurden, waren auf den Coomassie-gefärbten Gelen nur stark dunkel gefärbte Spuren, jedoch keine Proteinbanden zu erkennen (ohne Abbildung).

Um hochmolekulare Verbindungen des BHI-Mediums von den Kulturen fernzuhalten, wurden die Organismen in Dialyseschläuchen angezogen (2.9.2.1). Das Wachstum der Zellen konnte durch Messung der optischen Dichte bei 578 nm verfolgt werden. Dabei wurden in den stationären Phasen je nach *Listeria*-Stamm optische Dichten bei 578 nm von 2,0 und mehr erreicht, die erheblich über denen herkömmlicher *Listeria*-Kulturen liegen (maximale $OD_{578\text{nm}}$ ca. 1,4).

Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß die Anzucht in Dialyseschläuchen eine Diffusion von wachstumshemmenden Stoffwechselprodukten aus den Bakterienkulturen ermöglicht und zugleich neue Nährstoffe von außen zu den Zellen diffundieren können.

Eine Wachstumskurve für *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b) bei Anzucht in "Dialyseschlauchkultur" ist in Abbildung 36 dargestellt.

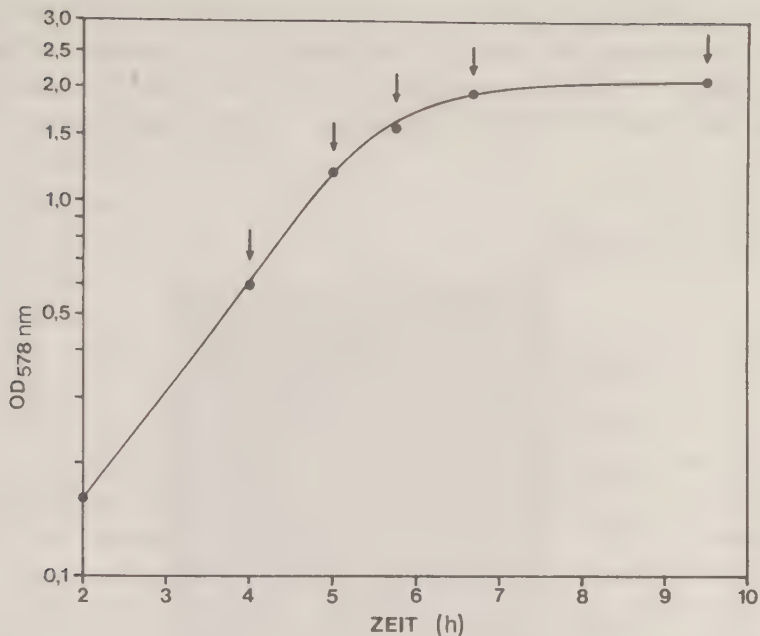


Abbildung 36:

Wachstum von *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b) in "Dialyseschlauchkultur".

Zu den mit Pfeilen markierten Zeiten wurden Anteile aus den Kulturen entnommen und Exoproteinpräparationen für die SDS-PAGE (siehe Abbildung 37) durchgeführt.

Zu verschiedenen Zeiten (in Abbildung 36 durch Pfeile gekennzeichnet), bei denen sich die Zellen in der logarithmischen oder stationären Wachstumsphase befanden, wurden Anteile aus den Kulturen entnommen. Anschließend wurden bei allen Proben die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert und die Zelltrockengewichte bestimmt.

Der jeweils 25 mg Zelltrockengewicht entsprechende Kulturüberstand wurde, wie unter 2.9.2 dargestellt, aufbereitet. Der Nachweis der TCA-gefällten Proteine erfolgte durch

Elektrophorese in einem SDS-Polyacrylamidgel (10 % Acrylamid). Wie aus Abbildung 37 ersichtlich ist, waren Proteine nur dann deutlich nachweisbar, wenn sich die Kulturen am Ende der logarithmischen bzw. in der stationären Wachstumsphase befanden.

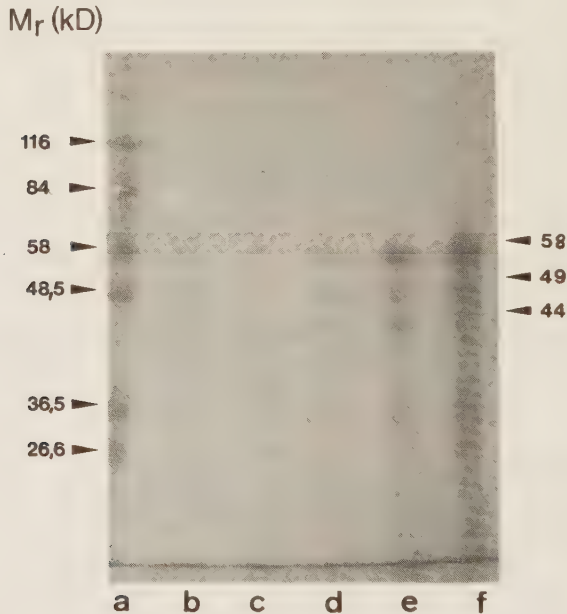


Abbildung 37:

SDS-PAGE zum Nachweis der Exoproteine von *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b) bei verschiedenen optischen Dichten (OD_{578nm}) in "Dialyseschlauchkultur" (siehe Abbildung 36). Aufgetragen sind ein Molekulargewichtsmarker-Gemisch (a) sowie Exoproteinpräparate aus Kulturen mit einer OD_{578nm} von 0,60 (b), 1,20 (c), 1,55 (d), 1,95 (e) und 2,10 (f). Es wurde jeweils der 25 mg Zelltrockengewicht entsprechende Kulturüberstand für die SDS-PAGE aufbereitet. Die Proteine wurden durch Färbung des Gels mit Coomassie sichtbar gemacht.

Daraus ist zu schließen, daß *L. monocytogenes* ATCC 19115 erst zum Ende der logarithmischen Wachstumsphase Exoproteine sezerniert. Das erhaltene Proteinmuster umfaßt Polypeptide mit Molekulargewichten von ungefähr 58, 49, 44 und 34 kD (vergleiche Abbildung 35).

Im Vergleich zum Gesamtzellproteinmuster (siehe Abbildung 34) lieferte der Kulturüberstand nur wenige intensiv angefärbte Banden. Es ist deshalb anzunehmen, daß die nachgewiesenen Proteine von den Zellen durch Sezernierung und nicht durch lytische Vorgänge freigesetzt wurden. Zudem konnte im Phasenkontrastmikroskop bei keiner der untersuchten Wachstumsphasen Lyse von Zellen beobachtet werden. Um die Möglichkeit der Lyse-bedingten Freisetzung der extrazellulären Proteine auszuschließen, wurden die Kulturüberstände auf das Vorhandensein von DNA und RNA untersucht. Der Nachweis von Nucleinsäuren erfolgte durch Elektrophorese in Agarosegelen, die Ethidiumbromid enthielten (2.12.2). Dabei wurden Proben, die jeweils 50 µl Kulturüberstand entsprachen und DNA des Bakteriophagen Lambda (1 µg) als Kontrolle aufgetragen. Die Kulturüberstände von Zellen der logarithmischen und stationären Wachstumsphasen enthielten weder DNA noch RNA (ohne Abbildung). Dies sprach für die Abwesenheit von Bakteriolyse, unter der Annahme, daß von eventuell lysierten Zellen stammende DNA und RNA nicht durch Nucleasen abgebaut worden waren.

Zum Vergleich der Exoproteinmuster wurden *L. monocytogenes*-Stämme der Serovarietät 1/2a (ATCC 19111), 3a (ATCC 19113) und 4b (ATCC 19115 und SLCC 5778) in "Dialyseschlauchkultur" angezogen. Die extrazellulären Proteine wurden jeweils aus dem 25 mg Zelltrockengewicht entsprechenden Kulturüberstand der logarithmischen und stationären Wachstumsphase präpariert und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Durch Coomassie-Färbung der Gele waren Exoproteine aus Kulturüberständen des logarithmischen Wachstums nicht oder nur in geringen Mengen nachzuweisen (Abbildung 38).



Abbildung 38:

SDS-PAGE zum Nachweis von Exoproteinen bei *L. monocytogenes*-Stämmen unterschiedlicher Serovarität in der logarithmischen (Spuren a, c, e und h) und frühen stationären Wachstumsphase (Spuren b, d, f und i).

(a) und (b), *L. monocytogenes* ATCC 19111 (SV 1/2a);

(c) und (d), *L. monocytogenes* ATCC 19113 (SV 3a);

(e) und (f), *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b);

(g), Molekulargewichtsmarker-Gemisch;

(h) und (i), *L. monocytogenes* SLCC 5778 (SV 4b)

Zum Nachweis der Proteine wurde das Gel mit Coomassie gefärbt.

Exoproteinpräparationen aus Kulturen der stationären Wachstumsphase lieferten dagegen in allen Fällen, mit Ausnahme von *L. monocytogenes* SLCC 5778, ähnliche Bandenmuster, die sich aus den für *L. monocytogenes* ATCC 19115 charakteristischen Polypeptiden mit Molekulargewichten von ungefähr 58, 49 und 44 kD zusammensetzen. Die für *L. monocytogenes* ATCC 19115 nachgewiesene 34 kD-Bande ist hier nur andeutungsweise zu erkennen (vergleiche Abbildung 35).

L. monocytogenes SLCC 5778, der avirulente Vakzine-Stamm, weist lediglich eine schwach angefärbte Proteinbande bei ca. 49 kD auf. ⁹

Die *L. monocytogenes*-Stämme verschiedener Serovarietäten, ausgenommen *L. monocytogenes* SLCC 5778, unterscheiden sich in ihren Exoproteinbandenmustern bei der Auftrennung nach Molekulargewichten offensichtlich nicht. Zur weiteren Charakterisierung der Exoproteine dieser Stämme, wurden Kulturüberstände aus den stationären Wachstumsphasen durch isoelektrische Fokussierung analysiert (2.12.3).

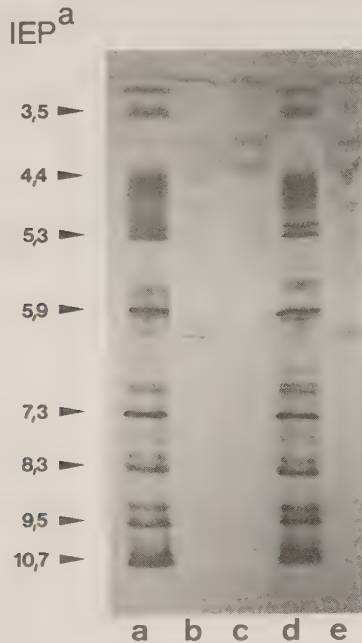


Abbildung 39:

Isoelektrische Fokussierung der Exoproteine von *L. monocytogenes*-Stämmen unterschiedlicher Serovarietät.

(a) und (d), Proteintestmischung; (b), *L. monocytogenes* ATCC 19111 (SV 1/2a); (c), *L. monocytogenes* ATCC 19113 (SV 3a); (e), *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b)

^a Isoelektrischer Punkt

Die Aufbereitung der Kulturüberstände erfolgte wie unter 2.9.2 beschrieben. Die 20 mg Zellen (Trockengewicht) entsprechende Exoproteinmenge wurde jedoch ohne vorherige Fällung mit Trichloressigsäure direkt auf das Gel aufgetragen.

Wie aus Abbildung 39 ersichtlich ist, sind sich die Exoproteinmuster der Serovarietäten 1/2a (ATCC 19111), 3a (ATCC 19113) sowie 4b (ATCC 19115) sehr ähnlich, wobei zwei Banden jeweils dominieren. Die isoelektrischen Punkte dieser beiden Proteine liegen im Vergleich mit entsprechenden Standardproteinen zwischen 3,5 und 4,4. Es handelt sich demnach um saure Polypeptide. Basische Proteine hingegen konnten in keinem Fall nachgewiesen werden. Die leichten Verzerrungen der Banden sind auf restliches Salz in den Proben zurückzuführen.

Die Exoproteine der untersuchten *Listeria*-Stämme verhalten sich demnach nicht nur bezüglich ihrer Molekulargewichte, sondern auch ihrer isoelektrischen Punkte identisch.

3.7.3 Präparation der Exoproteine von Kulturen in ultrafiltriertem Medium

Für die Präparation von Exoproteinen wurden die Stämme *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b), *L. monocytogenes* SLCC 2482 (SV 7), *L. innocua* ATCC 33090 (SV 6a), *L. innocua* ATCC 33091 (SV 6b), *L. welshimeri* SLCC 5334 (SV 6a), *L. ivanovii* ATCC 19119 (SV 5) und *L. seeligeri* SLCC 3954 (SV 1/2b) auf ultrafiltriertem BHI-Medium angezogen (2.9.2.2). Die Methode der Ultrafiltration des Mediums an PM 10-Membranen, bei der Substanzen mit einem Molekulargewicht größer 10.000 D zurückgehalten werden, diente der Entfernung höhermolekularer Bestandteile und wurde alternativ zur Kultivierung im Dialyseschlauch angewendet.

Kulturüberstände von Zellen der frühen stationären Wachstumsphase ($OD_{578nm}=1,2-1,4$) wurden, wie unter 2.9.2 dargestellt, aufbereitet. Mit Trichloressigsäure konnten in allen

Fällen, ausgenommen *L. ivanovii* und *L. seeligeri*, Exoproteine gefällt werden. *L. ivanovii* und *L. seeligeri* bildeten offensichtlich unter den angewendeten Bedingungen keine oder nicht nachzuweisende Mengen an extrazellulären Proteinen. Der Nachweis von Exoproteinen der übrigen Stämme erfolgte durch SDS-PAGE (Abbildung 40).

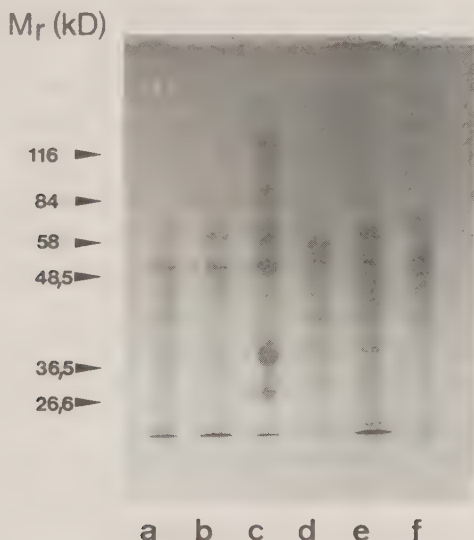


Abbildung 40:

SDS-PAGE zum Nachweis von Exoproteinen bei verschiedenen *Listeria*-Spezies (Coomassie-gefärbtes Gel).

(a), *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b); (b), *L. monocytogenes* SLCC 2482 (SV 7); (c), Molekulargewichtsmarker-Gemisch; (d), *L. innocua* ATCC 33090 (SV 6a); (e), *L. innocua* ATCC 33091 (SV 6b); (f), *L. welshimeri* SLCC 5334 (SV 6a)

L. monocytogenes Serovarietät 7 unterscheidet sich mit einem 58 kD- und 49 kD-Protein als Hauptkomponenten des Exoproteinmusters nicht von den übrigen *L. monocytogenes*-Stämmen. Unterschiedliche Exoproteinmuster weisen die anderen *Listeria*-Stämme auf. Neben einer allen Stämmen gemeinsamen

Proteinbande bei ca. 51 kD konnten für *L. innocua* SV 6a ein 55 kD-, für *L. innocua* SV 6b ein 57 kD- und für *L. welshimeri* ein 65 kD-Exoprotein nachgewiesen werden. Nach diesen Ergebnissen ermöglicht die SDS-PAGE von Exoproteinen offensichtlich eine Differenzierung verschiedener *Listeria*-Spezies, nicht jedoch der Serovarietäten von *L. monocytogenes*.

Inwieweit die Exoproteine der untersuchten *L. monocytogenes*-Stämme, die sich weder bezüglich ihres scheinbaren Molekulargewichtes noch ihrer isoelektrischen Punkte unterscheiden, immunologisch und strukturell verwandt sind, muß noch untersucht werden. Zudem ist zu klären, ob die Polypeptide innerhalb der Bandenmuster bezüglich ihrer Struktur originär sind, oder ob die 49 kD- und 44 kD-Proteine Modifikationen bzw. proteolytische Abbauprodukte des 58 kD-Proteins darstellen.

Die Fragen nach der immunologischen und strukturellen Verwandtschaft der Exoproteine könnten durch Immunoblotting mit Proteinbanden-spezifischen Antikörpern und der Methode der Peptidkartierung (Gooderham, 1987) beantwortet werden. Untersuchungen zur Funktion dieser extrazellulären Proteine bei *Listerien* wurden nicht durchgeführt.

3.7.4 Nachweis der Antigenität der Exoproteine durch Immunoblotting

Ziel der Immunoblot-Experimente war, Exoproteine verschiedener *Listeria*-Stämme mit Hilfe von O-Anti-*Listeria*-Seren als antigene Oberflächenkomponenten nachzuweisen. Verwendet wurden O-Antiseren, die durch Immunisierung von Kaninchen mit hitzeabgetöteten Zellen gewonnen wurden und demnach nur Antikörper enthalten sollten, die gegen Zelloberflächenantigene gerichtet sind. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß aufgrund endogener Lyse von Zellen bei der Immunisierung auch Komponenten des Cytoplasmas und der Zellmembran dem Immunsystem als Antigene präsentiert werden können.

Die Durchführung des Immunoblottings erfolgte wie unter 2.16.4 dargestellt. Exoproteine und Gesamtzellproteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf Nitrocellulosefilter transferiert. Der Proteintransfer wurde durch Anfärben der Filter mit Amidoschwarz kontrolliert. Nachdem die Filter mit dem entsprechenden O-Antiserum sowie anschließend mit Protein A(^{125}J) inkubiert worden waren, erfolgte der Nachweis antigener Proteine durch Autoradiographie.

Ein erstes Immunoblotexperiment wurde mit Exoproteinen sowie Gesamtzellproteinen von *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b) und homologem O-Antiserum durchgeführt. Die extrazellulären Proteine stammten in diesem Fall von "Dialyseschlauchkulturen" (vergleiche 3.7.2). Die Gesamtzellproteine wurden durch Kochen von Zellen mit SDS-PAGE-Probenpuffer erhalten (siehe 3.6.2).

In Abbildung 41 A sind die durch SDS-PAGE und anschließenden Transfer auf Nitrocellulosefilter erhaltenen Proteinmuster dargestellt. Das Ergebnis des Immunoblots zeigt das Autoradiogramm in Abbildung 41 B.

Eine starke Immunreaktion lieferten das 58 kD- und 44 kD-Exoprotein (Spur b). Aufgrund einer Schwärzung im Bereich zwischen der 58 kD- und 44 kD-Bande war eine Reaktion des 49 kD-Polypeptids nicht zu erkennen. Drei weitere Proteine mit Molekulargewichten von 30-40 kD, die auf dem Nitrocellulosefilter durch Anfärben mit Amidoschwarz nicht nachzuweisen waren, zeigten ebenfalls eine positive Immunreaktion. Von den zahlreichen Banden der Gesamtproteinfraktion der Zellen reagierten nur vier, die Molekulargewichten von ca. 58, 54, 44 und 38 kD entsprachen, mit dem homologen O-Antiserum (Spuren c u. d). Es ist deshalb anzunehmen, daß es sich bei diesen Proteinen um Oberflächenantigene handelt, wobei die 58 kD- und 44 kD-Bande den entsprechenden Exoproteinen zuzuordnen sind. Die drei Proteine des Exoproteinmusters im Bereich von 30-40 kD stellen möglicherweise Abbauprodukte des 58 kD- oder 44 kD-Polypeptids dar.

M_r (kD)

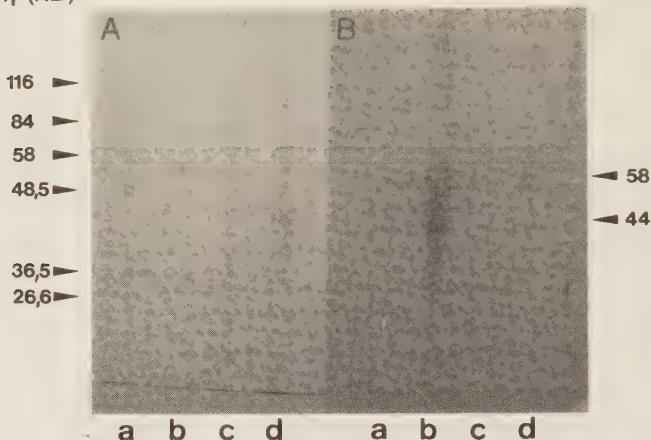


Abbildung 41 A u. B:

Immunoblot-Experiment mit Exoproteinen sowie Gesamtzellproteinen von *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b) und homologem O-Antiserum.

Aufgetrennt wurden ein Molekulargewichtsstandard (a), extrazelluläre Proteine von 25 mg trockenen Zellen (b) und Gesamtzellproteine von 2 mg (c) und 5 mg (d) nassen Zellen.

A: Amidoschwarz-gefärbter Nitrocellulosefilter nach dem Transfer der über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine

B: Autoradiogramm des mit Antiserum und anschließend Protein A (^{125}J) inkubierten Nitrocellulosefilters

Um die Exoproteine von *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b) auf mögliche Kreuzreaktionen mit heterologen O-Anti-Listeria-Seren zu untersuchen, wurde ein weiteres Immunoblotexperiment durchgeführt. Die extrazellulären Proteine stammten von Kulturen in ultrafiltriertem BHI-Medium. Das heterologe O-Antiserum war gegen *L. monocytogenes* ATCC 19113 (SV 3a) gerichtet.

Wie das Kontrollexperiment mit dem homologen O-Antiserum zeigte, reagierten das 58 kD- und das 44 kD-Protein positiv (Abbildung 42 A). Zusätzlich konnte in diesem Fall eine

Immunreaktion für das 49 kD-Exoprotein nachgewiesen werden. Eine Antigen-Antikörper-Reaktion lieferten diese drei Proteine jedoch auch im Immunoblot mit O-Antiserum gegen die Serovarietät 3a (Abbildung 42 B). Zudem traten im heterologen Testsystem eine Reihe weiterer Banden auf.

Da die 58 kD-, 49 kD- und 44 kD-Exoproteinantigene von *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b) mit O-Antiserum gegen die Serovarietät 3a kreuzreagierten, können sie nicht als spezifisch für die Serovarietät 4b angesehen werden.

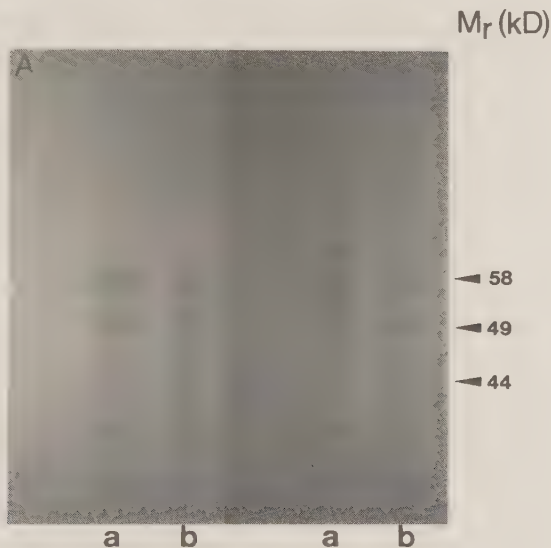


Abbildung 42 A u. B:

Immunoblot-Experiment mit Exoproteinen von *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b) und O-Antiserum gegen die Serovarietät 4b (A) oder Serovarietät 3a (B).

Aufgetrennt wurden extrazelluläre Proteine von 20 mg (a) und 10 mg (b) trockenen Zellen.

3.8 Vorkommen und Struktur von Lipoteichonsäuren in der Gattung Staphylococcus

Wie einleitend erwähnt, besitzt *S. aureus* H eine Lipoteichonsäure, deren Struktur in Abbildung 5 wiedergegeben ist (Duckworth et al., 1975). Bei den Stämmen *S. epidermidis*, *S. carnosus*, *S. haemolyticus* und *S. saccharolyticus*, früher als *Peptococcus saccharolyticus* bezeichnet (Kilpper-Bälz und Schleifer, 1981), konnten ebenfalls Lipoteichonsäuren nachgewiesen werden (Ruhland, 1984). Ihre quantitative und qualitative Zusammensetzung sowie das dünnschichtchromatographische Verhalten ihrer Lipidanteile wurden analysiert. Danach besitzen die Lipoteichonsäuren dieser Stämme die gleiche Struktur wie die authentische Lipoteichonsäure von *S. aureus* H, wobei die Poly(Glycerinphosphat)-Ketten nur mit D-Alanin substituiert sind und Gentiobiosyl-Diacylglycerin den Glycolipidanteil bildet.

Ein möglichst umfassendes Bild über das Vorkommen und die Struktur von Lipoteichonsäuren bei Staphylokokken, das eine Aussage zur taxonomischen Relevanz dieser Polymere ermöglicht, sollte durch die Untersuchung weiterer Vertreter dieser Gattung erhalten werden. Zu diesem Zweck wurden die Spezies *S. capitis*, *S. cohnii*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. simulans* und *S. warneri* ausgewählt. Diese Organismen repräsentieren verschiedene "Spezies-Gruppen" der Gattung *Staphylococcus*, die sich auf der Basis von DNA/DNA-Hybridisierungsexperimenten und phänotypischen Merkmalen ergeben (Schleifer et al., 1979; Kloos, 1980; Kloos und Schleifer, 1981).

Die Lipoteichonsäure von *S. aureus* H diente als Kontrolle bei den durchgeführten Versuchen.

3.8.1 Nachweis und Reinigung der Lipoteichonsäuren

Zum Nachweis von Lipoteichonsäuren wurden aufgebrochene Zellen der zu untersuchenden Stämme mit Phenol/Wasser extra-

hiert (2.7) und die wässrigen, dialysierten Phasen jeweils an Octyl-Sepharose chromatographiert (2.11.1.2). Das Elutionsprofil der Chromatographie, das aus dem Phosphatgehalt einzelner Fraktionen resultierte, ist für *S. simulans* in Abbildung 43 dargestellt.

Es ergaben sich zwei Gipfel, von denen der eine (Gipfel I) nicht an Octyl-Sepharose bindendes, der andere mit dem Gel interagierendes Material (Gipfel II) enthielt. Eine äqui-

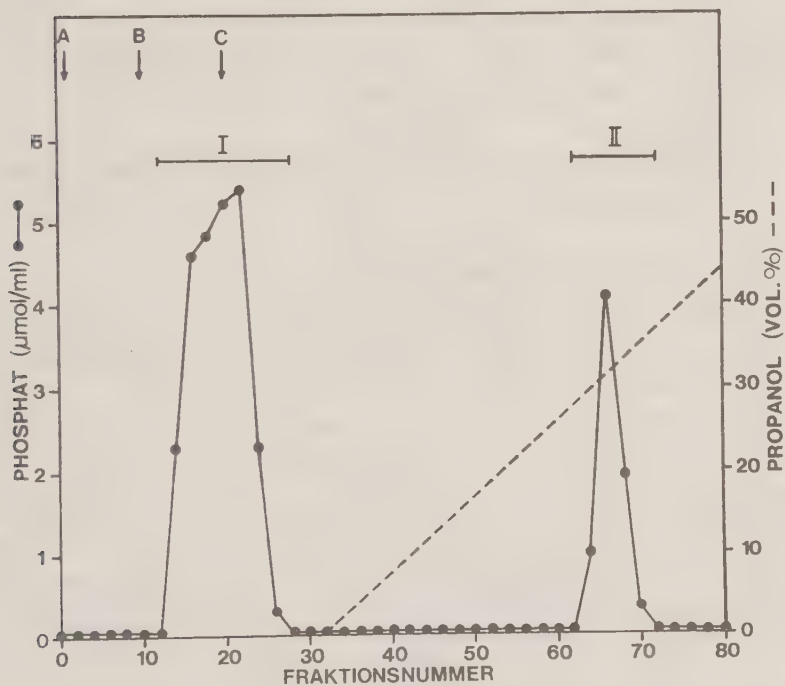


Abbildung 43:

Chromatographie des Phenol/Wasser-extrahierten und dialysierten Materials aus *S. simulans* an Octyl-Sepharose CL-4B. Der Extrakt von ca. 4 g Zellen (Naßgewicht) wurde auf die Säule gebracht. Es wurde das gleiche Elutionsverfahren wie in Abbildung 12 (3.1.1) angewendet.

valente Auftrennung lieferte die Chromatographie des Phenol/Wasser-extrahierten Materials von Zellen der übrigen *Staphylococcus*-Stämme.

Für das Vorliegen von Lipoteichonsäuren in Fraktionen von Gipfel II der untersuchten Stämme sprachen (1) der hohe Phosphatgehalt, (2) die amphiphilen Eigenschaften und (3) ein entsprechend großes Molekulargewicht der Substanzen, daß sie Dialysemembranen nicht passieren konnten.

Durch die biochemische Analyse der an Octyl-Sepharose bindenden Substanzen (siehe unten) konnte die Vermutung, daß in allen Fällen Lipoteichonsäuren vorhanden sind, bestätigt werden. Danach liegen Glycerin und Phosphat jeweils in etwa äquimolaren Mengen vor. Estergebundenes D-Alanin ist als zusätzliche Komponente vorhanden.

3.8.2 Qualitative und quantitative Zusammensetzung der Lipoteichonsäuren

Die Lipoteichonsäure-enthaltenden Fraktionen der Chromatographie an Octyl-Sepharose (Abbildung 43, Gipfel II) wurden jeweils vereinigt und für die biochemische Untersuchung gegen H₂O bidest. dialysiert.

Durch HF-Behandlung (60%ige wässrige HF, 0 °C, 16 h) freigesetzte Bruchstücke der Lipoteichonsäuren wurden direkt oder nach Hydrolyse mit 2 M HCl (100 °C, 3 h) gaschromatographisch analysiert. Glycerin und Glucose waren bei allen untersuchten Lipoteichonsäuren nach HF-Behandlung und HCl-Hydrolyse nachzuweisen (Tabelle 25). Als zusätzliche Komponente tritt bei den Stämmen *S. cohnii*, *S. hominis*, *S. saprophyticus* und *S. simulans* Glucosamin auf. Durch HF-Behandlung der Lipoteichonsäuren ohne anschließende Hydrolyse mit HCl konnte in allen Fällen Glycerin freigesetzt werden. Daraus ist abzuleiten, daß Glycerin in den Lipoteichonsäuren über Phosphodiesterbindungen verknüpft ist. Bei den Glucosamin-enthaltenden Lipoteichonsäuren wurde neben Glycerin ein weiteres HF-Fragment gaschromatographisch

Tabelle 25:

Ergebnisse der gaschromatographischen Analyse von HF-Fragmenten der Lipoteichonsäuren verschiedener *Staphylococcus*-Stämme vor und nach Hydrolyse mit 2 M HCl (100 °C, 3 h).

Spezies	Durch GC identifizierte Komponenten	
	HF-Fragmente	HF-Fragmente hydrolysiert
<i>S. aureus</i> H		
<i>S. capitis</i>	Glycerin	Glycerin
<i>S. sciuri</i>		Glucose
<i>S. warneri</i>		
<i>S. cohnii</i>	Glycerin	Glycerin
<i>S. hominis</i>		Glucose
<i>S. saprophyticus</i>	Glucosaminyll-	Glucosamin
<i>S. simulans</i>	(α 1-2)Glycerin ^a	

^aAuthentisches Glucosaminyll(α 1-2)Glycerin, das aus der Poly-(Glycerinphosphat)-Teichonsäure von *S. xylosus* präpariert wurde, diente als Referenz.

nachgewiesen. Die Retentionszeit dieses Fragments entsprach der von authentischem Glucosaminyll(α 1-2)Glycerin, das als Referenz aus der Poly(Glycerinphosphat)-Teichonsäure von *S. xylosus* präpariert wurde (Fiedler und Steber, 1984). Das Auftreten dieses HF-Bruchstücks weist auf eine teilweise Substitution von Glycerinresten mit α -glycosidisch gebundenem Glucosamin hin. Die Quantifizierung einzelner Komponenten der Lipoteichonsäuren erfolgte nach Hydrolyse mit 60%iger wässriger HF (0 °C, 16 h) und 2 M HCl (100 °C, 3 h). Alanin und Glucosamin wurden am Aminosäurenanalysator, Glycerin enzymatisch bestimmt. Die molaren Verhältnisse der Komponenten zu Phosphat sind in Tabelle 26 zusammengestellt.

Tabelle 26:

Molare Verhältnisse der Komponenten in den untersuchten Lipoteichonsäuren verschiedener *Staphylococcus*-Stämme zu Phosphat (=1,00).

Stamm	Molare Verhältnisse der Komponenten zu Phosphat (=1,00)			
	Glycerin	Glucose	Alanin	Glucosamin
<i>S. aureus</i> H	1,1	0,10	0,45	---
<i>S. capitis</i>	1,1	n.b. ^a	0,25	---
<i>S. cohnii</i>	0,9	0,10	0,01	0,04
<i>S. hominis</i>	0,8	0,07	0,11	0,15
<i>S. saprophyticus</i>	1,1	0,18	0,14	0,07
<i>S. sciuri</i>	1,1	0,07	0,13	---
<i>S. simulans</i>	0,8	0,07	0,17	0,07
<i>S. warneri</i>	1,2	0,07	0,15	---

^anicht bestimmt

Das molare Verhältnis von Glycerin zu Phosphat im Bereich von 1:1 weist auf das Vorliegen von Poly(Glycerinphosphat)-Ketten hin. Glucose, ein möglicher Bestandteil der Glycolipidanteile der Lipoteichonsäuren, ist nur in geringen Mengen vorhanden.

Alanin tritt in allen Fällen als Komponente der Lipoteichonsäuren auf. Die D-Konfiguration konnte mit Hilfe der D-Aminosäureoxidase-Reaktion (2.14.3) bestimmt werden. Alanyl-glycerin, das am Aminosäurenanalysator nachgewiesen wurde, liegt in sämtlichen HF-Hydrolysaten der untersuchten Lipoteichonsäuren vor (Daten nicht angegeben). Aus den Verhältnissen von Alanin zu Phosphat läßt sich entnehmen, daß bei allen Stämmen, mit Ausnahme von *S. cohnii*, zwischen 11 % und 45 % der Glycerinreste in den Lipoteichonsäuren substituiert vorliegen.

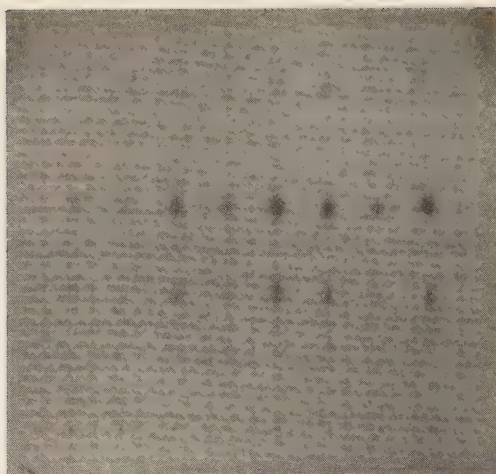
Im Fall von Glucosamin, das bei den Lipoteichonsäuren von *S. cohnii*, *S. hominis*, *S. saprophyticus* und *S. simulans* nachzuweisen war, wurden molare Verhältnisse zu Phosphat zwischen 0,04 und 0,15 bestimmt. Dies weist zusammen mit dem Auftreten von Glucosaminyl(α 1-2)Glycerin in den HF-Hydrolysaten dieser Lipoteichonsäuren auf eine Substitution von 4-15 % der Glycerinphosphatreste mit Glucosamin hin. Es ist anzunehmen, daß Glucosamin in Analogie zu bisher untersuchten, Glucosamin enthaltenden Zellwandpolymeren N-acetyliert vorliegt.

3.8.3 Strukturanalyse der Lipidanteile der Lipoteichonsäuren

Die Lipidanker und die Bestandteile der hydrophilen Poly(Glycerinphosphat)-Ketten wurden nach Behandlung der Lipoteichonsäuren mit 60%iger wässriger HF (0 °C, 16 h) durch Extraktion mit Chloroform/Methanol/Wasser (1:1:0,9, v/v) voneinander getrennt (2.17.4). Die Lipidanteile in den Chloroformphasen und die hydrophilen HF-Bruchstücke in den wässrigen Überständen wurden nach Hydrolyse mit 2 M HCl (100 °C, 3 h) gaschromatographisch analysiert.

Als Komponenten der Lipidanker der untersuchten Lipoteichonsäuren konnten in allen Fällen nur Glycerin und Glucose nachgewiesen werden. In den wässrigen Überständen waren große Mengen Glycerin, aber keine Glucose vorhanden. Damit wurde gezeigt, daß Glucose nur in den Lipidanteilen nicht jedoch als Substituent der Poly(Glycerinphosphat)-Ketten vorliegt.

Die durch HF-Behandlung der Lipoteichonsäuren und anschließende Chloroform/Methanol/Wasser-Extraktion gewonnenen Glycolipidanker wurden dünnschichtchromatographisch analysiert. Als Vergleich diente der authentische Glycolipidanker aus *S. aureus* H. Wie aus Abbildung 44 ersichtlich ist, lieferte die Auftrennung der Glycolipidanteile sämtlicher Lipoteichonsäuren jeweils drei Flecken, von denen einer (B) intensiv, die beiden anderen (A und C) nur schwach mit



a b c d e f g h

Abbildung 44:

Vergleich der Glycolipidanker der Lipoteichonsäuren verschiedener *Staphylococcus*-Stämme durch Dünnschichtchromatographie.

Platte: Kieselgel 60; Laufmittel: Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4, v/v); Nachweisreagenz: Phenol/H₂SO₄

(a), *S. hominis* ; (b), *S. saprophyticus* ; (c), *S. cohnii* ;
(d), *S. sciuri* ; (e), *S. aureus* H ; (f), *S. simulans* ;
(g), *S. warneri* ; (h), *S. capitis*

Phenol/Schwefelsäure-Reagenz angefärbt wurden. Für *S. aureus* H konnte nachgewiesen werden, daß Substanz B den Glycolipidanker Gentiobiosyl-Diacylglycerin darstellt, während es sich bei den Substanzen A und C um Fragmente von B handelt, die durch Hydrolyse von Acyl- (C) oder Glycosidbindungen (A) bei der HF-Behandlung entstehen (Ruhland, 1984). Die Glycolipidanteile (B) aller untersuchten Lipoteichonsäuren zeigen demnach das gleiche dünnschichtchromatographische Verhalten wie Gentiobiosyl-Diacylglycerin.

Dieses Resultat spricht zusammen mit den Ergebnissen der gaschromatographischen Analyse der Lipidanteile (siehe oben) für Gentiobiosyl-Diacylglycerin als gemeinsamen Glycolipid-

anker aller bisher von Vertretern der Gattung *Staphylococcus* untersuchten Lipoteichonsäuren.

3.8.4 Nachweis der Lipoteichonsäuren durch Gelelektrophorese

Die aus den *Staphylococcus*-Stämmen präparierten Lipoteichonsäuren wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gradientengelelektrophorese (7,5-30 % Acrylamid) aufgetrennt (2.12.1.3). Zum Vergleich wurde die aus *S. aureus* H isolierte Zellwandteichonsäure auf das Gel aufgetragen. Wie in Abbildung 45 dargestellt ist, lieferten die Lipoteichonsäuren sowie die



Abbildung 45:

Nachweis und Vergleich der Lipoteichonsäuren aus *S. capitis* (b), *S. sciuri* (c), *S. hominis* (d), *S. cohnii* (e), *S. aureus* H (f), *S. warneri* (g), *S. simulans* (h), *S. saprophyticus* (i) und der Teichonsäure aus *S. aureus* H (a) durch SDS-Polyacrylamid-Gradientengelelektrophorese.

Gel: 7,5-30 % Acrylamid;

Nachweis: Phosphatfärbung mit "Stains-All"

Teichonsäure von *S. aureus* H bei der Phosphatfärbung der Gele mit "Stains-All" einzelne, dunkelblaue Flecken. Sämtliche Lipoteichonsäuren zeigten ein ähnliches Laufverhalten, während sich die Teichonsäure durch eine etwas längere Laufstrecke im Gel unterschied.

3.8.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Nach den hier und in einer vorhergehenden Arbeit erhaltenen Ergebnissen (Ruhland, 1984) scheinen Lipoteichonsäuren bei allen Vertretern der Gattung *Staphylococcus* vorzukommen. Die Lipoteichonsäuren weisen eine einheitliche Grundstruktur auf, wie sie für *S. aureus* H in Abbildung 5 wiedergegeben ist. Gentiobiosyl-Diacylglycerin bildet jeweils den Lipidanteil und ist kovalent mit einer Poly(Glycerinphosphat)-Kette verknüpft. Die Glycerinreste der hydrophilen Kette sind in allen Fällen, mit Ausnahme von *S. cohnii*, teilweise D-Alanin-substituiert. Bei den Stämmen *S. cohnii*, *S. hominis*, *S. saprophyticus* und *S. simulans* tritt jedoch N-Acetylglucosamin als zusätzlicher Substituent auf.

3.9 Untersuchung von Vertretern verschiedener Gattungen Gram-positiver Bakterien auf das Vorkommen von Lipoteichonsäuren oder anderen amphiphilen Polymeren

Die bereits in einer vorausgehenden Arbeit (Ruhland, 1984) begonnene Untersuchung Gram-positiver Bakterien verschiedener taxonomischer Gruppen auf das Vorliegen von Lipoteichonsäuren sollte systematisch fortgesetzt werden. Zu diesem Zweck wurden die Stämme *B. cereus*, *B. macerans*, *B. acidocaldarius*, *Aerococcus viridans*, *Brochothrix thermosphacta*, *Deinococcus radiodurans*, *Mycobacterium phlei* und *Oerskovia turbata* ausgewählt. Es war das Ziel, ein möglichst breites Bild über die Verbreitung von Lipoteichonsäuren oder anderen amphiphilen Polymeren der Zellmembran Gram-positiver Bakterien zu erhalten, um Aussagen über ihre taxonomische und phylogenetische Relevanz zu ermöglichen.

3.9.1 Nachweis und Reinigung der amphiphilen Polymere

Der Nachweis und die Reinigung der amphiphilen Polymere erfolgte unter Anwendung der Chromatographie an Octyl-Sepharose CL-4B, wie für Vertreter der Gattung *Listeria* unter 3.1.1 beschrieben. Jede zweite Fraktion der Chromatographie an Octyl-Sepharose wurde auf Phosphat- und Neutralzucker untersucht (Elutionsprofile nicht abgebildet).

Keine amphiphilen Substanzen konnten aus *B. acidocaldarius*, *B. macerans*, *Deinococcus radiodurans* und *Oerskovia turbata* isoliert werden.

An Octyl-Sepharose bindendes Material wurde jedoch bei *B. cereus*, *Brochothrix thermosphacta*, *Aerococcus viridans* und *Mycobacterium phlei* nachgewiesen. Über die isolierten Substanzen können die folgenden Aussagen getroffen werden: (1) Sie sind amphiphiler Natur, da sie sich bei der Phenol/Wasser-Extraktion von Zellen in der wässrigen Phase lösen, gleichzeitig aber an Octyl-Sepharose binden. (2) Es handelt sich um Polymere, da sie von Dialysemembranen

zurückgehalten werden.

Fraktionen, die mit Octyl-Sepharose interagierendes Material enthielten, wurden jeweils vereinigt und ihr Gesamtgehalt an Phosphat und Neutralzucker bestimmt. Nach saurer Hydrolyse mit 2 M HCl (100 °C, 3 h) erfolgte der Nachweis von Alanin am Aminosäureanalysator. Für die enzymatische Bestimmung von Glycerin wurden die Proben zusätzlich mit 60%iger wässriger Flußsäure (0 °C, 16 h) behandelt.

Die amphiphilen Polymere aus *B. cereus* und *Brochothrix thermosphacta* zeichneten sich durch einen hohen Phosphatgehalt aus. Das Verhältnis Glycerin zu Phosphat lag für *B. cereus* bei 1,1, für *Brochothrix thermosphacta* bei 1,0. Alanin, von dem die D-Konfiguration anzunehmen ist, wurde in beiden Fällen nachgewiesen. Der molare Alanin/Phosphat-Quotient betrug für *B. cereus* 0,54, für *Brochothrix thermosphacta* 0,48. Das Vorliegen von Alanin sowie das äquimolare Verhältnis von Glycerin zu Phosphat sprachen für das Vorhandensein von Lipoteichonsäuren bei diesen Stämmen. Die amphiphilen Polymere aus *Aerococcus viridans* und *Mycobacterium phlei* wiesen einen hohen Neutralzucker- aber sehr niedrigen Phosphatgehalt auf. Glycerin konnte jeweils nur in Spuren nachgewiesen werden.

Es handelt sich demnach hier um andere amphiphile Polymere als Lipoteichonsäuren.

3.9.2 Gaschromatographische Untersuchung der isolierten amphiphilen Polymere

Die aus *B. cereus* und *Brochothrix thermosphacta* präparierten Lipoteichonsäuren sowie die amphiphilen Polymere von *Aerococcus viridans* und *Mycobacterium phlei* wurden nach Behandlung mit 60%iger wässriger Flußsäure (0 °C, 16 h) bzw. nach HF-Behandlung und zusätzlicher Hydrolyse mit 2 M HCl (100 °C, 3 h), gaschromatographisch analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 27 zusammengefaßt.

Tabelle 27:

Durch Gaschromatographie identifizierte Komponenten der Lipoteichonsäuren aus *B. cereus* und *Brochothrix thermosphacta* sowie der amphiphilen Polymere aus *Aerococcus viridans* und *Mycobacterium phlei*.

In Klammern gesetzte Komponenten sind nur in Spuren vorhanden.

Stamm	Durch GC identifizierte Komponenten	
	HF-Fragmente	HF-Fragmente hydrolysiert
<i>Bacillus cereus</i>	Gro	Gro, Glc
<i>Brochothrix thermosph.</i>	Gro, Glc(α 1-2)Gro ^a	Gro, Glc
<i>Aerococcus viridans</i>	(Gal), (Glc)	Gal, Glc, GalN oder ManN
<i>Mycobacterium phlei</i>	(Rib), (Man)	Rib, Man

^aAuthentisches Glucosyl(α 1-2)Glycerin, das aus der Teichonsäure von *B. subtilis* DSM 10 präpariert wurde, diente als Referenz.

Die Lipoteichonsäure aus *B. cereus* enthielt Glycerin und Glucose. Glycerin wurde durch HF-Behandlung nahezu quantitativ freigesetzt und ist demnach über Phosphodiesterbindungen verknüpft. Glucose war nur in geringen Mengen nachzuweisen und scheint eine Komponente des Lipidankers der Lipoteichonsäure zu sein.

Durch HF-Behandlung der Lipoteichonsäure aus *Brochothrix thermosphacta* in der ebenfalls Glycerin und Glucose enthalten sind, konnte neben Glycerin ein weiteres HF-Fragment freigesetzt werden (Tabelle 27). Die Retentionszeit dieses Fragments entsprach der von authentischem Glucosyl(α 1-2)Glycerin, das als Referenz aus der Teichonsäure von *B. subtilis* DSM 10 durch HF-Behandlung präpariert

wurde. Es handelt sich dabei um eine α -glucosylierte Poly(Glycerinphosphat)-Teichonsäure (Glaser und Burger, 1964). Das Auftreten von Glc(α 1-2)Gro als HF-Bruchstück der Lipoteichonsäure aus *Brochothrix thermosphacta* weist auf eine teilweise Substitution von Glycerinresten mit α -glycosidisch gebundener Glucose hin. Da keine weitere Hexose neben Glucose nachgewiesen werden konnte, ist anzunehmen, daß Glucose ebenfalls Komponente des Lipidanteils der Lipoteichonsäure ist.

Das amphiphile Polymer aus *Aerococcus viridans* enthält Galactose, Glucose und Galactosamin oder Mannosamin, das aus *Mycobacterium phlei* die Zucker Ribose und Mannose. Die Komponenten liegen jeweils glycosidisch und nicht über Phosphodiester verknüpft vor, da sie durch HF-Behandlung ohne HCl-Hydrolyse nur in sehr geringen Mengen freigesetzt werden.

Die isolierten Lipoteichonsäuren sowie die anderen amphiphilen Polymere bedürfen jedoch einer weiteren Untersuchung, zur Aufklärung ihrer exakten Struktur.

3.10 Biochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Zelloberfläche von pathogenen und nicht-pathogenen Staphylococcus-Stämmen bei Anzucht in Human-Blutplasma und HD-Medium

Wie bereits erwähnt, existieren eine Reihe von Hinweisen, daß die Zusammensetzung und die biologischen Eigenschaften der Zellhülle von den Anzuchtbedingungen der Mikroorganismen beeinflußt werden. Niedrige Wachstumsraten, subinhibitorische Antibiotikakonzentrationen und insbesondere Nährstoffmangel, mit denen pathogene Bakterien "in vivo", beim Wachstum im Wirtsorganismus, konfrontiert werden, können phänotypische Veränderungen an der Zelloberfläche hervorrufen (Brown und Williams, 1985).

Bei der Beurteilung der Zelloberfläche als einen möglichen Faktor einer Pathogenese ist deshalb von entscheidender Bedeutung, inwieweit unsere Kenntnisse über die Biochemie der Oberflächen von Mikroorganismen, die in der Regel auf "in vitro"-Untersuchungen basieren, auch unter "in vivo"-Bedingungen relevant sind. Unter diesem Aspekt sollten pathogene und nicht-pathogene Vertreter der Gattung *Staphylococcus*, die Stämme *S. aureus* (DSM 20231, DSM 20232 und DSM 20491), *S. aureus* H, *S. epidermidis* DSM 20044 und *S. xylosus* DSM 20266, betrachtet werden.

Ein Problem bei der biochemischen Analyse der Zelloberfläche "in vivo" gewachsener Bakterien ist jedoch, genügend Zellmaterial zu erhalten. Um zumindest eine angenäherte "in vivo"-Situation darzustellen, wurden die ausgewählten Staphylokokken in Human-Blutplasma angezogen.

3.10.1 Anzucht von Staphylokokken in Human-Blutplasma

Das Antibiotika-freie Human-Blutplasma wurde steril in Erlenmeyerkolben abgefüllt und zur Überprüfung der Sterilität für 48 h bei 37 °C bebrütet. Die Anzucht der *Staphylokokken* erfolgte aerob bei 37 °C unter leichtem Schütteln.

Infolge von Zellverklumpung und starker Eigentrübung des Plasmas konnte das Wachstum nur mit Einschränkung durch Messung der optischen Dichte verfolgt werden. Nach Wachstumszeiten von 48-72 h waren jedoch, wie phasenkontrastmikroskopisch zu erkennen, größt mögliche Zelldichten erreicht; die Kulturen befanden sich in der stationären Wachstumsphase. Die Wachstumsraten der untersuchten Staphylokokken in Human-Blutplasma lagen um ein vielfaches niedriger als bei Anzucht unter gleichen Bedingungen in HD-Medium.

Für die biochemische Untersuchung der Zelloberfläche wurden die Zellen nach der Ernte intensiv mit kalter (4 °C) physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und anschließend weiteren Präparationsschritten unterworfen.

3.10.2 Untersuchung von *S. aureus* H auf Lipoteichonsäure bei Anzucht in Human-Blutplasma

Zellen von *S. aureus* H, die aus Human-Blutplasmakulturen stammten, wurden aufgeschlossen und mit wässrigem Phenol extrahiert (2.7). Die wässrige Phase des Extraktes wurde dialysiert und über Octyl-Sepharose CL-4B chromatographiert. An Octyl-Sepharose bindendes Material, das bei einer Propanolkonzentration von ca. 35 Vol.% eluierte und einen hohen Phosphatgehalt aufwies, zeigte das Vorliegen von Lipoteichonsäure an (vergleiche Abbildung 12, 3.1.1).

Die Zusammensetzung der Lipoteichonsäure wurde nach Behandlung mit 60%iger wässriger HF (0 °C, 16 h) und Hydrolyse mit 2 M HCl (100 °C, 3 h) am Gaschromatographen und Aminosäurenanalysator bestimmt. Als einzige Komponenten konnten dabei Glycerin, Glucose und Alanin nachgewiesen werden. Alanylglycerin wurde neben Glycerin als Bestandteil von HF-Hydrolysaten identifiziert und wies auf eine teilweise Substitution von Glycerinresten der Poly(Glycerinphosphat)-Ketten mit Alanin hin.

S. aureus H synthetisiert demnach auch bei Wachstum unter

angenäherten "in vivo"-Bedingungen Lipoteichonsäure. Die Anzucht der Zellen in Human-Blutplasma oder HD-Medium beeinflusste dabei die qualitative Zusammensetzung der Lipoteichonsäuren nicht.

3.10.3 Biochemischer Vergleich der Zellwandzusammensetzung von in Human-Blutplasma und HD-Medium angezogenen Staphylokokken

Um zu untersuchen, inwieweit ein Wachstum unter angenäherten "in vivo"-Bedingungen die Zusammensetzung der Zellwand beeinflusst, wurden die Stämme *S. aureus* (DSM 20231, DSM 20232 und DSM 20491), *S. aureus* H, *S. epidermidis* DSM 20044 und *S. xylosus* DSM 20266 sowohl in Human-Blutplasma als auch HD-Medium angezogen.

Tryptisch gereinigte Zellwände wurden von Zellen der stationären Wachstumsphase, wie unter 2.5.2 beschrieben, präpariert. Die Bestimmung der quantitativen Aminosäure- und Aminosuckerzusammensetzung der Zellwände erfolgte nach Hydrolyse mit 4 M HCl (100 °C, 16 h) am Aminosäurenanalysator. Die Konzentrationen und molaren Verhältnisse der identifizierten Komponenten sind in Tabelle 28 wiedergegeben.

Wie aus den Molverhältnissen der Aminosäuren und Aminosucker hervorgeht, war der Glycingehalt bei allen auf Human-Blutplasma angezogenen Stämmen, ausgenommen *S. epidermidis*,

Tabelle 28: (Seite 168)

Quantitativer Aminosäure-, Aminosucker- und NH₃-Gehalt tryptisch gereinigter Zellwände verschiedener *Staphylococcus*-Stämme nach Anzucht in HD-Medium und Human-Blutplasma.

Die Komponenten wurden nach Hydrolyse der Zellwände mit 4 M HCl (100 °C, 16 h) am Aminosäurenanalysator quantifiziert.

°HD: Hefe-Dextrose-Medium; Pl: Human-Blutplasma

°Durch Säurehydrolyse aus D-Glutaminsäure-Carboxylamid freigesetzter Ammoniak

°Typstamm

Stamm/ Wachstumsmedium ^a		nmol/mg Zellwände							Molverhältnisse (Glu=1,0)							
		Glu	Lys	Ala	Gly	Ser	Mur	GlcN	HH ₃ ^b	Lys	Ala	Gly	Ser	Mur	GlcN	NH ₃ ^b
S. aureus	HD	441	466	1051	1896	--	414	804	550	1,1	2,4	4,3	---	1,0	1,8	1,3
DSM 20231 ^r	Pl	286	293	733	562	96	254	625	379	1,0	2,6	2,0	0,3	0,9	2,2	1,3
S. aureus	HD	416	420	912	1792	23	400	696	466	1,0	2,3	4,3	0,1	1,0	1,6	1,1
DSM 20232	Pl	184	138	392	504	--	91	362	200	0,8	2,1	2,7	---	0,5	2,0	1,1
S. aureus	HD	275	309	664	1296	96	266	612	397	1,1	2,4	4,7	0,4	1,0	2,2	1,4
DSM 20491	Pl	236	212	598	464	70	121	600	320	0,9	2,5	2,0	0,3	0,5	2,5	1,4
S. aureus	HD	440	456	1104	1920	74	392	832	448	1,0	2,5	4,4	0,2	0,9	1,9	1,0
Stamm H	Pl	208	180	576	408	74	100	672	288	0,9	2,8	2,0	0,4	0,5	3,2	1,4
S. epiderm.	HD	506	608	1130	1488	759	572	726	484	1,2	2,2	2,9	1,5	1,1	1,4	1,0
DSM 20044 ^r	Pl	236	236	546	672	137	208	320	314	1,0	2,3	2,9	0,6	0,9	1,0	1,3
S. xylosus	HD	496	488	904	1660	37	512	496	398	1,0	1,8	3,4	0,1	1,0	1,0	0,8
DSM 20266 ^r	Pl	356	330	652	890	116	332	798	392	0,9	1,8	2,5	0,3	0,9	2,2	1,0

Tabelle 28:

(Legende: Seite 167)

im Vergleich zu den "in vitro"-Kontrollen um bis zu 57 % reduziert. Im Falle von *S. epidermidis* erwies sich Serin als erheblich gegenüber Glutaminsäure vermindert. Die Molverhältnisse der übrigen Aminosäuren der Mureine waren in Plasma- und HD-Medium-kultivierten Organismen nahezu identisch. Die teilweise zu beobachtende Verminderung von Muraminsäure gegenüber Glutaminsäure im Fall der auf Plasma kultivierten Stämme ist experimentell bedingt. Dagegen ist die mit Ausnahme von *S. epidermidis* zum Teil drastische Steigerung von Glucosamin in den Zellwänden von in Human-Blutplasma angezogenen Stämmen von struktureller Relevanz (siehe unten).

Nachdem Glycin und Serin bei Staphylokokken Komponenten der Interpeptidbrücken im Murein sind, war auf Grund der Ergebnisse von Tabelle 28 angezeigt, daß im Murein von "in vivo"-Zellen die Struktur und/oder der Grad der Quervernetzung erheblich gegenüber "in vitro"-Zellen verändert sind.

Die Untersuchungen von dinitrophenylierten Zellwänden lieferten dazu konkrete Hinweise (Tabelle 29).

Die Reaktion der ϵ -Aminogruppe von Lysin mit FDNB im Fall der Zellwände von "in vivo"-Zellen (dünnschichtchromatographischer Nachweis von ϵ -DNP-Lys) und die dadurch bedingte Absenkung des Molverhältnisses Lys:Glu=0,6 verdeutlicht, daß nur ca. 60 % der Peptiduntereinheiten Glycinreste der Interpeptidbrücken tragen. Entsprechend dem Verhältnis von Gly:Glu=2,0 weisen diese demzufolge mittlere Kettenlängen von drei bis vier Glycinresten auf. 20 % der Glycinreste und demzufolge ca. 70 % der Interpeptidbrücken sind dinitrophenylierbar (dünnschichtchromatographischer Nachweis von DNP-Gly), so daß im Murein von *S. aureus* DSM 20231 bei Anzucht in Human-Blutplasma unter angenäherten "in vivo"-Bedingungen weniger als 20 % der Peptiduntereinheiten quervernetzt sind.

Unter "in vitro"-Bedingungen sind dagegen die ϵ -Aminogruppen der Lysinreste der Peptiduntereinheiten vollständig mit Interpeptidbrücken, die durchschnittlich mehr als vier

Tabelle 29:

Vergleich der molaren Verhältnisse von Komponenten der dinitrophenylierten und nicht-dinitrophenylierten Zellwand aus *S. aureus* DSM 20231 nach Anzucht in HD-Medium und Human-Blutplasma.

Anzuchtmedium ^a / FDNB-Behandlung		Molare Verhältnisse (Glu=1,0)					
		Lys	Ala ^b	Gly	Ser	Mur	GlcN
HD	FDNB	1,0	2,1	3,9	-	0,7	1,8
	--	1,1	2,4	4,3	-	1,0	1,8
Pl	FDNB	0,6	2,0	1,6	-	0,7	2,0
	--	1,0	2,6	2,0	0,3	0,9	2,2

^aHD: Hefe-Dextrose-Medium; Pl: Human-Blutplasma

^bEnthält estergebundenes und dinitrophenylierbares D-Alanin der Teichonsäuren (nicht analysiert im Detail)

Glycinreste enthalten, besetzt. Die Quervernetzung beläuft sich dabei auf mehr als 60 %.

Der verminderte Glycin-Anteil und die damit in Zusammenhang stehenden Veränderungen im Murein der "in vivo"-Zellen sind offenbar bedingt durch den relativ niedrigen Glycin-Gehalt im Human-Blutplasma. Durch Supplementierung mit 0,25 % Glycin wurde die Zusammensetzung der Zellwand von *S. aureus* DSM 20231 verändert. Das Molverhältnis von Glutaminsäure:Lysin: Alanin:Glycin:Muraminsäure:Glucosamin betrug 1,0:1,2:2,3: 4,7:0,8:2,5. Damit war der Glycinanteil sogar etwas höher als bei den Zellwänden, die von auf HD-Medium gewachsenen Staphylokokken stammten (vergleiche Tabelle 28).

Wie aus Tabelle 28 zu entnehmen ist, lagen bei den in Human-Blutplasma gewachsenen Staphylokokken die Konzentrationen an Mureinkomponenten pro 1 mg Zellwand erheblich unter den Werten der "in vitro"-Kontrollen. Der unter "in vivo"-

Bedingungen reduzierte Mureinanteil der Zellwände korrelierte bei den Stämmen, deren Teichonsäuren N-Acetylglucosamin-substituiert sind, mit einem erhöhten Molverhältnis Glucosamin zu Glutaminsäure. Beide Befunde ließen vermuten, daß Teichonsäuren "in vivo" einen erheblich größeren Anteil an den Zellwänden ausmachen. Diese Annahme wurde durch Quantifizierung des Phosphatgehalts der Zellwände bestätigt. Zellwände, die von in Blutplasma gewachsenen Zellen präpariert wurden, zeichneten sich in allen Fällen durch ein mindestens doppelt so großes Molverhältnis von Phosphat zu Glutaminsäure aus als die entsprechenden "in vitro"-Kontrollen (Tabelle 30).

Tabelle 30:

Vergleich der Molverhältnisse Phosphat zu Glutaminsäure in Zellwänden von in HD-Medium und Human-Blutplasma gewachsenen Staphylokokken.

Stamm	Molares Verhältnis	
	Wachstums- medium ^a	Phosphat/Glutaminsäure ^b
S. aureus DSM 20231 ^c	HD	1,8
	Pl	4,2
S. aureus DSM 20232	HD	1,5
	Pl	4,6
S. aureus H	HD	1,7
	Pl	5,6
S. epidermidis DSM 20044 ^c	HD	1,7
	Pl	3,3

^a HD: Hefe-Dextrose-Medium; Pl: Human-Blutplasma

^b Glutaminsäure wurde nach Hydrolyse der Zellwände mit 4 M HCl (100 °C, 16 h) am Aminosäurenanalysator quantifiziert.

^c Typstamm

Mit Hilfe der Daten zur quantitativen Zusammensetzung der Zellwände läßt sich der Teichonsäure- und Mureingehalt bezogen auf das Zellwandgesamtgewicht berechnen. Im Beispiel von *S. aureus* DSM 20231 enthielten die von "in vitro"-angezogenen Zellen stammenden Zellwände ca. 60 Gew.% Murein und ca. 40 Gew.% Teichonsäure. Bei den Zellen der "in vivo"-Kultur war das Verhältnis invers (nur ca. 40 Gew.% Murein und 60 Gew.% Teichonsäure).

Nach den erhaltenen Resultaten bringt das Wachstum von Staphylokokken auf Human-Blutplasma, d.h. unter angenäherten "in vivo"-Bedingungen, gegenüber üblichen Laborkulturen ("in vitro"-Kontrollen) wesentliche biochemische Veränderungen an der Zelloberfläche mit sich:

- (1) Ausbildung eines um ca. 60-70 % geringer quervernetzten Mureins aufgrund von Glycinmangel im Blutplasma
- (2) Erhöhung des Teichonsäureanteils am Zellwandgesamtgewicht von ca. 40 % auf ca. 60 %

Der Anteil von Lipoteichonsäure am Zellgewicht bleibt hingegen unverändert.

3.10.4 Elektronenmikroskopische Untersuchung von in Human-Blutplasma und HD-Medium angezogenen Staphylokokken

Um zu prüfen, ob im Zusammenhang mit den biochemischen auch cytologische Veränderungen an der Zelloberfläche bei Wachstum in Human-Blutplasma auftreten, wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. G. Wanner (Botanisches Institut, Universität München) elektronenmikroskopische Studien an ausgewählten Stämmen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Stämme *S. aureus* DSM 20231 und *S. epidermidis* DSM 20044 bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase sowohl in HD-Medium als auch Human-Blutplasma angezogen, die geernteten Zellen mehrmals mit Tris/HCl-Puffer (0,05 M, pH 7,5) gewaschen und wie unter 2.17.9 beschrieben, für die Elektronenmikroskopie aufbereitet.

Wie aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Dünn-

schnitten am Beispiel von *S. aureus* ersichtlich ist, wiesen sowohl in HD-Medium als auch in Human-Blutplasma angezogene Zellen keine Unregelmäßigkeiten bezüglich ihrer Zellgröße, Zellgestalt, Zellwanddicke und Septierung auf (Abbildung 46-49). Zellen, die aus den Blutplasmakulturen stammten, waren jedoch in allen Fällen von einer auffälligen Zellwandauflagerung umgeben (Abbildung 48-50). Das, den Zellwänden anhaftende Material überzog die gesamte Zelloberfläche als eine "Kapsel-ähnliche" Schicht von unregelmäßiger Dicke. Diese Zellwandauflagerungen erwiesen sich als Proteinase-sensitiv (Pronase, Trypsin und Proteinase K) und entsprachen demnach Protein(en) (ohne Abbildung).

Um nachzuweisen, daß es sich dabei um eine phänotypische Variation im Zuge des Wachstums auf Human-Blutplasma handelt, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Zellen von *S. aureus* und *S. epidermidis*, die aus Blutplasmakulturen stammten, wurden durch Zentrifugation steril geerntet, mit HD-Medium gewaschen und in ein Kölbchen mit HD-Nährflüssigkeit überführt. Anschließend wurden die Organismen durch Schütteln bei 37 °C angezogen und das Wachstum durch Messung der optischen Dichte bei 578 nm verfolgt. Eine Entnahme von Aliquots aus den HD-Kulturen erfolgte zum Zeitpunkt Null sowie nach einer und zwei aufeinanderfolgenden Zellteilungen. Die Kontrollzellen, die zu Beginn des Wachstums entnommen wurden, waren von den charakteristischen Zellwandauflagerungen vollständig umgeben (vergleiche Abbildung 48). Zellen der ersten Generation (Abbildung 51 und 52) und zweiten Generation (ohne Abbildung) hingegen wiesen diese Proteinauflagerungen nur im Bereich der alten Zellwand (Bildung im Human-Blutplasma), nicht jedoch an Stellen der Zellwandneubildung, d. h. im Bereich des sich teilenden Septums (Bildung im HD-Medium), auf.

Zellen, die auf mit Dialysemembranen bedeckten Blutplasma-Agarplatten angezogen wurden, zeigten das Phänomen der "Saumbildung" nicht (ohne Abbildung). Wurden Zellen von *S. aureus* und *S. epidermidis*, die in HD-Medium kultiviert

worden waren, in Human-Blutplasma transferiert, waren die Zellen bereits nach einer Inkubationszeit von nur 2 min bei 37 °C von dem, für die "in vivo"-Anzucht typischen, "Kapsel-ähnlichen" Material umgeben (Abbildung 53).

Daraus ist zu folgern, daß es sich bei diesen "Kapsel-ähnlichen" Auflagerungen, die nur bei Anzucht der *Staphylococcus*-Stämme unter "in vivo"-Bedingungen auftraten, nicht um von den Zellen "de novo"-synthetisiertes Material, sondern um an den Zellwänden anhaftende Proteine des Human-Blutplasmas handelte.

Das hier beobachtete Phänomen der Adhäsion von Plasmaproteinen an die Zelloberfläche von Staphylokokken bei Anzucht in Human-Blutplasma konnte ebenso für *S. xylosus* DSM 20266 nachgewiesen werden (ohne Abbildungen).

Da diese Plasmaproteinauflagerungen unter "in vivo"-Bedingungen sowohl bei dem Koagulase-positiven-Stamm *S. aureus* DSM 20231 als auch den Koagulase-negativen-Stämmen *S. epidermidis* DSM 20044 und *S. xylosus* DSM 20266 auftraten, ist nicht anzunehmen, daß zellgebundene Koagulase ("clumping factor") eine Rolle bei der Anbindung von Plasmaproteinen an die Zelloberfläche spielt. Inwieweit Zelloberflächenkomponenten wie Teichon- und Lipoteichonsäuren dabei von Bedeutung sind, ist eine medizinisch wesentliche Frage, die bislang nicht untersucht wurde.

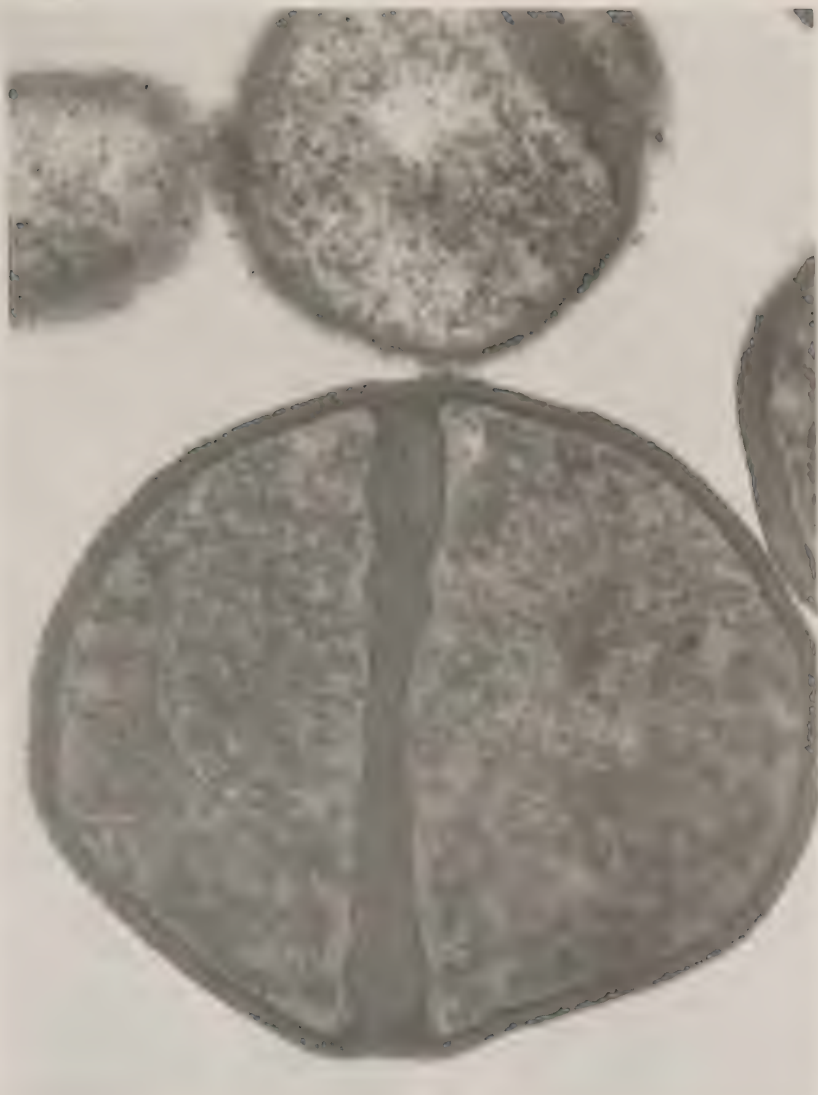


Abbildung 46:

Ultradünnschnitt durch Zellen von *A. aureus* SEM 20111 in
Elektronenmikroskop (Detail).

Anzucht: HD-Medium

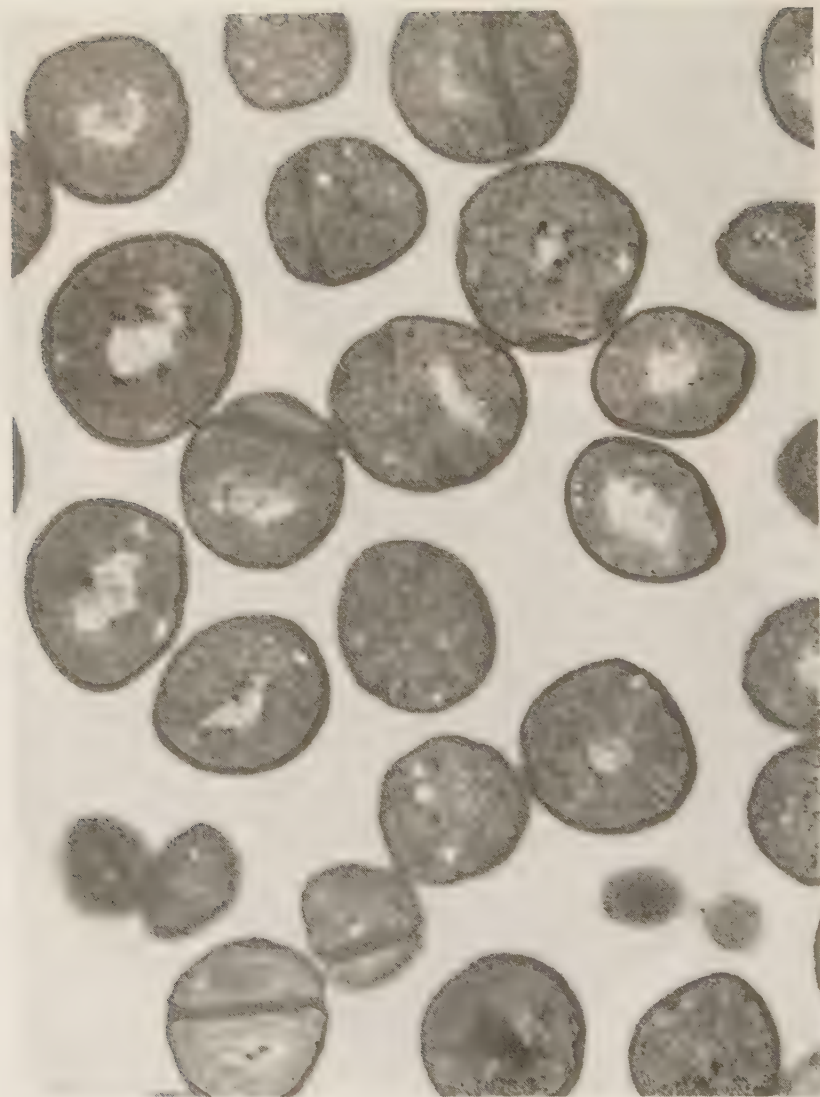


Abbildung 47:

Ultradünnschnitt durch Zellen von *S. aureus* DSM 20231 im Elektronenmikroskop (Übersicht).

Anzucht: HD-Medium



Abbildung 48:

Ultradünnschnitt durch eine Zelle von *S. aureus* DSM 20231 im Elektronenmikroskop (Detail).

Anzucht: Human-Blutplasma

Die "Kapsel-ähnlichen" Zellwandauflagerungen sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

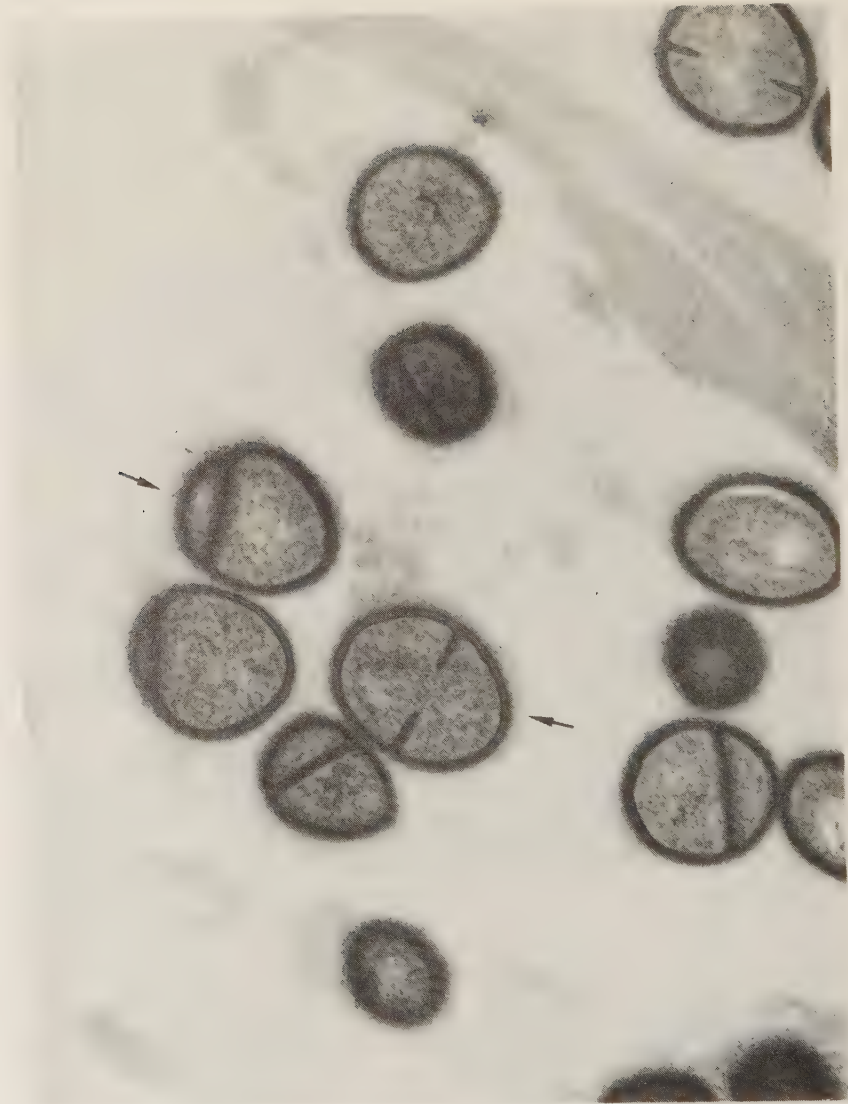


Abbildung 49:

Ultradünnschnitt durch Zellen von *S. aureus* DSM 20231 im Elektronenmikroskop (Übersicht).

Anzucht: Human-Blutplasma

Die "Kapsel-ähnlichen" Zellwandauflagerungen sind mit Pfeilen gekennzeichnet.



Abbildung 50:

Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ultradünnschnitts durch Zellen von *S. epidermidis* DSM 20044.

Anzucht: Human-Blutplasma

Die "Kapsel-ähnlichen" Zellwandauflagerungen sind durch Pfeile markiert.



Abbildung 51:

Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ultradünnschnitts durch Zellen von *S. aureus* DSM 20231.

Die Zellen wurden in Human-Blutplasma angezogen, anschließend in HD-Medium transferiert und nach einer Generation fixiert.

Zu beachten ist das Fehlen der Zellwandauflagerungen an Stellen des sich teilenden Septums (markiert durch Pfeile).

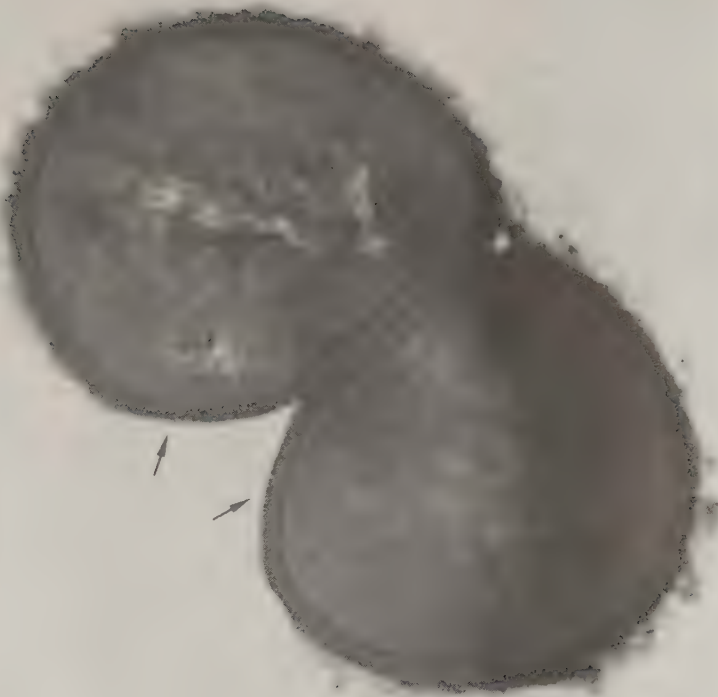


Abbildung 52:

Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ultradünnschnitts durch Zellen von *S. epidermidis* DSM 20044.

Die Zellen wurden in Human-Blutplasma angezogen, anschließend in HD-Medium transferiert und nach einer Generation fixiert.

Zu beachten ist das Fehlen der Zellwandauflagerungen an Stellen des sich teilenden Septums (markiert durch Pfeile).



Abbildung 53:

Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ultradünnschnitts durch Zellen von *S. aureus* DSM 20231.

Die Zellen wurden in HD-Medium angezogen, anschließend in Human-Blutplasma transferiert und nach 2 min fixiert.

Die "Kapsel-ähnlichen" Zellwandauflagerungen sind durch Pfeile gekennzeichnet.

4 DISKUSSION

4.1 Biochemie und Immunogenität von Zelloberflächenkomponenten in der Gattung *Listeria* und ihre Bedeutung für die serologische Klassifizierung und Pathogenität

Um Genus- und Serovarietäten-spezifische Antigene in der Gattung *Listeria* zu identifizieren, wurde die Biochemie und die Immunogenität der Zelloberfläche verschiedener *Listeria*-Stämme näher charakterisiert. Als mögliche Zelloberflächenantigene standen dabei Lipoteichonsäuren, Teichonsäuren und Proteine im Mittelpunkt der Untersuchungen.

Lipoteichonsäuren kommen bei allen Spezies und Serovarietäten der Gattung *Listeria* vor (Ruhland und Fiedler, 1986 und 1987). Dies zeigten die Untersuchungen in vorliegender Arbeit an den Stämmen *L. monocytogenes* SLCC 5782 (SV 1/2a), *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b), *L. ivanovii* ATCC 19119 (SV 5), *L. innocua* ATCC 33090 (SV 6a), *L. seeligeri* SLCC 3954 (SV 1/2b) und *L. welshimeri* SLCC 5334 (SV 6a) sowie vorhergehende Studien bei *L. monocytogenes* ATCC 15313 (SV 1/2a), *L. grayi* ATCC 19120 und *L. murrayi* ATCC 25401 (Ruhland, 1984).

Die mit Hilfe der Chromatographie an Octyl-Sepharose gereinigten Lipoteichonsäuren wurden biochemisch eingehend charakterisiert.

Der hydrophile Anteil der Lipoteichonsäuren besteht in allen Fällen aus einer Poly(Glycerinphosphat)-Kette, wobei die 1,3-Phosphodiester-verknüpften Glycerinreste an der C₂-Position teilweise mit estergebundenem D-Alanin (21-36 %) oder α -D-Galactopyranose (11-33 %) substituiert sind. Bei den Lipoteichonsäuren von *L. grayi* und *L. murrayi* fehlen jedoch die Galactosylsubstituenten. Für die durchschnittliche Länge der Poly(Glycerinphosphat)-Ketten wurden je nach Stamm 16-33 Glycerinphosphateinheiten berechnet.

Das Auftreten von monomeren Galactosylresten als Substi-

tuenten der Poly(Glycerinphosphat)-Ketten steht im Widerspruch zu den Befunden von Hether und Jackson (1983), die bei *L. monocytogenes* Serotyp 1 ein Galactose enthaltendes Disaccharid als Seitenkette der Lipoteichonsäure postulierten.

Den Lipidanteil der untersuchten Lipoteichonsäuren bildet ein α -Galactosyl- α -Glucosyl-Diacylglycerin, das sehr wahrscheinlich identisch mit einem für *L. monocytogenes* beschriebenen Membranlipid der Struktur O- α -D-Galactopyranosyl-(1-2)-O- α -D-Glucopyranosyl-(1-3)-Diacylglycerin ist (Shaw, 1970; Kosaric und Carrol, 1971). Diese Annahme wird sowohl durch das dünnschichtchromatographische Verhalten der Glycolipidanker als auch durch Ergebnisse von Fischer (1981) unterstützt, wonach sich die Lipidanteile der Lipoteichonsäuren von Glycolipiden der Cytoplasmamembran ableiten. Das Fettsäurespektrum der Lipidanker spiegelt die Fettsäurezusammensetzung der Cytoplasmamembran verschiedener *Listeria*-Stämme wider (Raines et al., 1968). Den Hauptanteil bilden dabei eine 15:0 anteiso und 17:0 anteiso verzweigte Fettsäure. Das Auftreten von Diacylglycerin als HF-Bruchstück der Lipoteichonsäuren aller untersuchten *Listeria*-Stämme, mit Ausnahme von *L. grayi* und *L. murrayi*, weist auf eine Phosphatidylsubstitution der Lipidanteile hin. Die genaue Lokalisation des Phosphatidylrestes wurde jedoch nicht untersucht.

Nach den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen besitzen die bei allen Spezies und verschiedenen Serovarietäten der Gattung *Listeria* vorkommenden Lipoteichonsäuren offensichtlich eine einheitliche Struktur, die schematisch in Abbildung 54 dargestellt ist. Zu berücksichtigen ist jedoch das Fehlen der Galactosyl- und Phosphatidylsubstitution bei den Stämmen *L. grayi* und *L. murrayi*.

Das dargestellte Strukturmodell wurde kürzlich durch ^{13}C -NMR-Spektroskopiestudien an den Lipoteichonsäuren der *Listeria*-Serotypen 4a, 4b, 6a und 6 bestätigt (Uchikawa et al., 1986a).

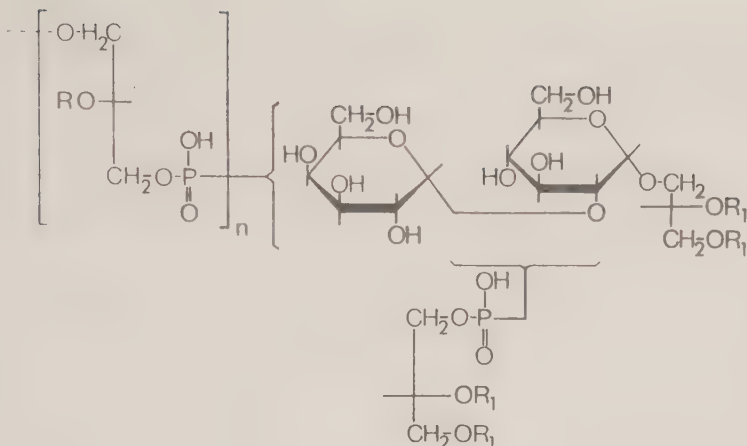


Abbildung 54:

Schematische Struktur der Lipoteichonsäuren verschiedener Spezies und Serovarietäten der Gattung *Listeria*.

R: D-Alanyl-, α -Galactopyranosyl- oder H-

R₁: Fettsäurerest, hauptsächlich 15:0 anteiso und 17:0 anteiso

n: 16-33

Die Antigenität der Lipoteichonsäuren wurde für *Listeria*-Stämme unterschiedlicher Serovarietät durch Immundoppeldiffusions-Experimente mit homologen O-Anti-*Listeria*-Seren nachgewiesen. Eine Antigen-Antikörper-Reaktion ergab sich jedoch auch bei der Immundoppeldiffusion der Lipoteichonsäuren gegen heterologe O-Anti-*Listeria*-Seren. Dies war aufgrund der strukturellen Identität der Lipoteichonsäuren verschiedener *Listeria*-Serovarietäten zu erwarten.

O-Antiseren gegen *L. monocytogenes*-Stämme der Serovarietäten 1/2a und 4b zeigten eine gute Immunreaktion mit der α -Galactosyl-substituierten Lipoteichonsäure aus *Sc. lactis* NCDO 712 (Fischer et al., 1980a). Die Lipoteichonsäuren von *L. grayi* und *L. murrayi* lieferten hingegen keine Immun-

präzipitate mit diesen Seren. Daraus wurde geschlossen, daß die α -Galactosylsubstituenten der Lipoteichonsäuren die immunodominanten Determinanten in diesem Molekül darstellen. Andererseits reagierten die *L. monocytogenes*-Antiseren mit der nicht α -galactosylierten Lipoteichonsäure von *S. aureus* H. Es wurde deshalb vermutet, daß die verwendeten Seren auch Antikörper gegen den Gentiobiosyl-Diacylglycerin-Lipidanker der Lipoteichonsäure enthielten.

Nach den erhaltenen Befunden stellen Lipoteichonsäuren in der Gattung *Listeria* somatische Antigene dar, die jedoch weder Genus- noch Serovarietäten-spezifisch sind.

Das Vorkommen strukturell uniformer Lipoteichonsäuren sowohl bei virulenten als auch avirulenten *Listeria*-Stämmen schließt ihre mögliche Beteiligung an pathogenen Prozessen nicht aus. Obwohl die β -Hämolysinproduktion ebenfalls nicht nur auf pathogene *Listeria*-Stämme beschränkt ist, stellt sie dennoch einen entscheidenden Virulenzfaktor bei *Listeria*-Infektionen dar. Dies wurde anhand nicht-hämolytischer Mutanten von *L. monocytogenes* nachgewiesen (Gaillard et al., 1986; Kathariou et al., 1987). Inwieweit Lipoteichonsäuren an Pathogenitätsmechanismen von Listerien beteiligt sind, ist jedoch nicht geklärt; möglicherweise spielen sie eine Rolle beim Eindringen des fakultativ-intrazellulären Parasiten in Makrophagen oder Gewebe des Wirtsorganismus (Brubaker, 1985).

Wexler und Oppenheim (1979 und 1980), Singh et al. (1981) und Siromashkova et al. (1986) berichteten über das Vorkommen Lipopolysaccharid-ähnlicher Substanzen in Phenol/-Wasser-Extrakten virulenter Stämme von *L. monocytogenes* der Serovarietäten 1/2a und 4b. Diese "*Listeria*-Lipopolysaccharide" wiesen eine Reihe biologischer Eigenschaften, einschließlich Toxizität und Pyrogenität in Kaninchen, auf, die für Endotoxine Gram-negativer Bakterien charakteristisch sind. Lipopolysaccharid-typische Komponenten wie β -Hydroxymyristinsäure, 2-Keto-3-Desoxyoctonsäure und Heptose waren

außerdem vorhanden. Bisher liegen jedoch nur Daten zur qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der "Listeria-Lipopolysaccharide" vor. Ihre Struktur sowie der Mechanismus der Verankerung in der Zelloberfläche des Gram-positiven Bakteriums *L. monocytogenes* wurden nicht aufgeklärt. Ungewöhnlicherweise wurden Lipoteichonsäuren in den Phenolextrakten der *Listeria*-Stämme nicht nachgewiesen.

Untersuchungen in dieser Arbeit sowie von Hether und Jackson (1983) und Uchikawa et al. (1986a) zeigen jedoch, daß es sich bei den aus Listerien durch Phenol/Wasser Extraktion und hydrophobe Chromatographie an Octyl-Sepharose gereinigten amphiphilen Substanzen eindeutig um Lipoteichonsäuren handelt, die keine für Lipopolysaccharide typischen biochemischen Merkmale aufweisen.

Wie am Beispiel der Gram-negativen Bakterien *Salmonella minnesota* SF III und *Pseudomonas aeruginosa* in vorliegender Arbeit gezeigt werden konnte, können mit Phenol/Wasser-extrahierte Lipopolysaccharide durch Chromatographie an Octyl-Sepharose gereinigt werden. Mit Hilfe dieses Verfahrens ist es möglich, sehr reine LPS-Präparate in nur kurzer Zeit zu erhalten, die frei von kontaminierenden Proteinen sind und ein für Lipopolysaccharide charakteristisches Muster bei der Auftrennung an Polyacrylamidgelen liefern. Die Chromatographie an Octyl-Sepharose sollte sich demnach auch zur Entfernung von Lipopolysacchariden aus medizinischen Präparaten (Entpyrogenisierung) eignen.

Zur quantitativen Erfassung der Lipopolysaccharide war es jedoch notwendig, die bei der Reinigung von Lipoteichonsäuren verwendete Chromatographieprozedur zu modifizieren. Dieses abgewandelte Verfahren wurde angewendet, um Phenol/Wasser-Extrakte ganzer Zellen eines pathogenen und eines nicht-pathogenen *Listeria*-Stammes (*L. monocytogenes* SV 4b und *L. innocua* SV 6a) mit Hilfe der Chromatographie an Octyl-Sepharose CL-4B auf das Vorkommen von Lipopolysacchariden zu untersuchen. Als Kontrolle dienten Zellen von *S. aureus* H. Um einen möglichen Verlust des Lipopolysaccharids

beim Abtöten der Zellen durch Erhitzen (100 °C, 15 min) zu überprüfen, wurden im Fall von *L. monocytogenes* SV 4b sowohl erhitzte als auch Formalin-behandelte Zellen für die Präparation verwendet.

Die an Octyl-Sepharose bindenden Substanzen zeichneten sich jeweils durch einen hohen Phosphatgehalt aus. Am Gaschromatographen und Aminosäurenanalysator waren lediglich die für die Lipoteichonsäuren dieser Stämme typischen Komponenten D-Alanin, Glycerin, Glucose und im Fall der *Listeria*-Stämme zusätzlich Galactose nachzuweisen. Nach den Ergebnissen des Thiobarbitursäuretests enthielten sämtliche Präparate geringe Mengen an 2-Keto-3-Desoxyoctonsäure (KDO) in einem Molverhältnis zu Phosphat von unter 0,01. Da jedoch auch das Kontrollpräparat von *S. aureus* H im KDO-Test positiv reagierte, ist anzunehmen, daß es sich hierbei um eine unspezifische Reaktion handelte.

Nach den hier erhaltenen biochemischen Befunden sind Lipoteichonsäuren die einzigen amphiphilen Polymere in den cytoplasmatischen Membranen von *Listeria*-Stämmen. Da Lipoteichonsäuren eine Reihe biologischer Aktivitäten mit den Lipopolysacchariden Gram-negativer Bakterien teilen (Wicken und Knox, 1980), sind die von Wexler und Oppenheim (1979 und 1980) für Phenolextrakte von *L. monocytogenes* SV 4b nachgewiesenen, Endotoxin-typischen biologischen Eigenschaften zum Teil auf das Vorhandensein von Lipoteichonsäuren zurückzuführen. Für die Toxizität und Pyrogenität des Phenol-extrahierten Materials sind möglicherweise Proteine verantwortlich, die nach Siromashkova et al. (1986) mit dem "*Listeria*-Lipopolysaccharid" assoziiert sind.

Ullmann und Cameron (1969) extrahierten immunologisch aktive Kohlenhydrate aus Zellwänden verschiedener *Listeria*-Sero-varietäten, die unterschiedliche Zuckerkomponenten als antigene Determinanten aufwiesen.

Fiedler et al. (1984) identifizierten diese sekundären Zellwandpolymere als Teichonsäuren. Ihre qualitative und quan-

titative Zusammensetzung sprach für das Vorliegen von Poly(Ribitphosphat)-Teichonsäuren, deren unterschiedliche Zuckerzusammensetzung eine Einteilung der untersuchten *Listeria*-Stämme in sechs Teichonsäuregruppen ermöglichte, die eine bemerkenswerte Korrelation mit entsprechenden Serovarietäten aufweisen. Aufgrund dieser Befunde wurde angenommen, daß Teichonsäuren möglicherweise an der serologischen Klassifizierung von *Listerien* beteiligt sind. Teichonsäuren wurden deshalb am Beispiel von *L. monocytogenes* SV 4b, *L. innocua* SV 6a und *L. innocua* SV 6b in der vorliegenden Arbeit strukturell eingehender charakterisiert. Die erhaltenen Daten zur quantitativen Zusammensetzung der Teichonsäuren stimmen mit denen von Fiedler et al. (1984) überein und ergeben molare Verhältnisse von Ribit:Glucosamin:Glucose:Galactose:Phosphat=1,0:1,1:0,7:0,7:1,3 für die Serovarietät 4b, Ribit:Glucosamin:Galactose:Phosphat=1,0:1,0:1,0:1,3 für die Serovarietät 6a und Ribit:Glucosamin:Glucose:Phosphat=1,0:1,1:0,8:1,3 für die Serovarietät 6b. Durch Spaltung mit wässriger Flußsäure wurden die Teichonsäuren in ihre Struktureinheiten zerlegt. Den Hauptbestandteil bildeten jeweils Bruchstücke aus Ribit, Glucosamin, Galactose und Glucose (*L. monocytogenes* SV 4b), Ribit, Glucosamin und Galactose (*L. innocua* SV 6a) sowie Ribit, Glucosamin und Glucose (*L. innocua* SV 6b). Nach den Ergebnissen der gaschromatographischen Analyse liegen die einzelnen Komponenten, die offensichtlich glycosidisch miteinander verbunden sind, jeweils in äquimolaren Verhältnissen vor. Ein Fragment aus Ribit und Glucosamin, das bei allen untersuchten Teichonsäuren in wesentlich geringerer Konzentration auftrat, wies auf eine direkte glycosidische Verknüpfung von Glucosamin und Ribit hin. Zusätzlich konnten verschiedene Teichonsäurebruchstücke detektiert werden, die nur in Spuren vorhanden waren und offensichtlich aus einer unspezifischen Hydrolyse glycosidischer Bindungen durch HF resultierten. Die Zusammensetzung dieser Fragmente indizierte, daß Glucose und/oder Galactose jeweils endständig am

Glucosamin und nicht am Ribit substituieren. Zwei Fragmente aus Glucosamin, Glucose und Glycerin sowie Mannosamin (oder Galactosamin) und Glucosamin, die in HF-Hydrolysaten der Teichonsäure von *L. monocytogenes* SV 4b enthalten waren, stammten vermutlich aus einer "linkage unit", welche die Anbindung der Teichonsäure an das Peptidoglycan vermittelt. Bei *L. monocytogenes* Stamm EGD erfolgt die Verknüpfung der Teichonsäure an die Hydroxylgruppe des C₆-Atoms von Muraminsäure über Glc(β1-3)Glc(β1-1/3)Gro-P-(3/4)-ManNAc(β1-4)GlcNAc (Kaya et al., 1985a).

Durch Periodatoxidation der Teichonsäuren wurden sämtliche Komponenten mit Ausnahme von Glucosamin gespalten. Glucosamin ist demnach der einzige Bestandteil in den Teichonsäuren, der keine nicht-substituierten vicinalen Hydroxylgruppen aufweist. Aufgrund der Resistenz von Glucosamin gegenüber Oxidation durch Periodat in den nicht-phosphorylierten "Teichonsäurebausteinen" von *L. innocua* SV 6a und *L. innocua* SV 6b wurde angenommen, daß Galactose bzw. Glucose jeweils am C₃- oder C₄-Atom des Glucosamins substituieren. Im Fall von *L. monocytogenes* SV 4b ist Glucose ebenfalls an das C₃- oder C₄-Atom des Glucosaminylrestes gebunden; die Position von Galactose am Glucosamin konnte mit den angewendeten Methoden nicht lokalisiert werden.

Durch die Anwendung spezifischer Glycohydrolasen wurde die Anomerie glycosidischer Bindungen innerhalb der "Teichonsäurebausteine" teilweise aufgeklärt. Eine Behandlung der Glucosaminylribit-Fragmente mit β-N-Acetylglucosaminidase führte in allen Fällen zu einer quantitativen Freisetzung von Glucosamin. Glucosamin liegt demnach in den Teichonsäuren N-acetyliert vor und ist β-glycosidisch an Ribit gebunden. Galactose ist nach den Ergebnissen der Glycohydrolasebehandlung jeweils α-glycosidisch mit N-Acetylglucosamin verknüpft. Trotz der nachgewiesenen Endständigkeit von Glucose in den Teichonsäurebruchstücken von *L. monocytogenes* SV 4b und *L. innocua* SV 6b konnten die Glucosesubstituenten weder mit α- noch β-Glucosidase

abgespalten werden. Es ist deshalb anzunehmen, daß diese Bruchstücke in einer Konformation vorliegen, in der Glucose für die entsprechende Glucosidase nicht zugänglich ist. Nach Ergebnissen von Jochmus (1986) inhibiert bei einem Teichonsäurefragment von *L. ivanovii* SV 5 ähnlicher Struktur der N-Acetylrest des N-Acetylglucosamins die Aktivität von β -Glucosidase.

Die Herstellung phosphorylierter Teichonsäurebruchstücke durch Hydrolyse der Teichonsäuren mit HCl oder NaOH lieferte einen Aufschluß über die Lokalisation der Phosphodiesterbrücken in den Teichonsäureketten. Danach liegen Ribit und N-Acetylglucosamin in den untersuchten Teichonsäuren jeweils phosphoryliert vor und bilden integrale Bestandteile der Teichonsäureketten. Galactose (SV 6a) oder Glucose (SV 6b) sowie Galactose und Glucose (SV 4b) substituieren an den N-Acetylglucosaminresten der Poly(N-Acetylglucosaminytribitphosphat)-Ketten.

Teichonsäuren des Poly(N-Acetylglucosaminytribitphosphat)-Typs, wie sie bei den *Listeria*-Serovarietäten 4b, 6a und 6b vorkommen, wurden bisher bei keiner Spezies anderer Gattungen Gram-positiver Bakterien gefunden.

^{13}C -NMR-Spektroskopiestudien, die kürzlich von Uchikawa et al. (1986b) an Teichonsäuren verschiedener *Listeria*-Serotypen durchgeführt wurden, bestätigten die hier erhaltenen Ergebnisse. Folgende Strukturen wurden für die sich wiederholenden Einheiten der Teichonsäuren postuliert:

-4-[Galactosyl(α 1-6)][Glucosyl(β 1-3)]N-Acetylglucosaminy-
(β 1-2)Ribit-5-Phosphat- für die Serovarietät 4b und
-4-N-Acetylglucosaminy(β 1-4)Ribit-5-Phosphat- für die
Serovarietät 6.

Galactose und Glucose, die demnach am C_3 -Atom des N-Acetylglucosamins der Teichonsäuren von *L. innocua* SV 6a bzw. *L. innocua* SV 6b substituieren und vermutlich wichtige antigene Determinanten darstellen, konnten jedoch von Uchikawa et al. (1986b) nicht als Komponenten der Teichonsäure der Serovarietät 6 identifiziert werden. Die quantita-

tiven Daten von Fiedler et al. (1984) zeigen jedoch ebenfalls, daß Galactose bzw. Glucose bei allen untersuchten Stämmen der Serotypen 6a und 6b vorhanden sind.

Weitere Untersuchungen zur Struktur von Teichonsäuren innerhalb der Gattung *Listeria* ergaben, daß Poly(N-Acetylglucosaminylribitphosphat)-Teichonsäuren auch bei *L. monocytogenes*-Stämmen der Serovarietäten 4a, 4d und 4f (Fujii et al., 1985; Uchikawa et al., 1986b) sowie *L. ivanovii* SV 5 (Jochmus, 1986) vorkommen. Die "Teichonsäureeinheiten" weisen die folgenden Strukturen auf:

-4-N-Acetylglucosaminyl(β 1-4)Ribit-5-Phosphat- für die Serovarietät 4a, -4-[Glucosyl(β 1-3)]N-Acetylglucosaminyl(β 1-2)-Ribit-5-Phosphat- für die Serovarietät 4d -4-[Galactosyl(α 1-6)][N-Acetylglucosaminyl(α 1-3)]N-Acetylglucosaminyl(β 1-2)Ribit-5-Phosphat- für die Serovarietät 4f und -3/4-[Glucosyl(β 1-6)]N-Acetylglucosaminyl(1-?)Ribit-?-Phosphat- für die Serovarietät 5.

Nach den Daten von Fiedler et al. (1984) ist die Teichonsäure von *L. monocytogenes* SV 4a mit Galactosylresten substituiert.

Das Vorkommen von Teichonsäuren des klassischen Poly(Ribitphosphat)-Typs, bei dem benachbarte Ribitreste über Phosphodiester 1,5-verknüpft sind, scheint auf *L. monocytogenes*-Stämme der Serovarietäten 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c und 7 sowie *L. seeligeri* SV 1/2b beschränkt zu sein (Fiedler et al., 1984; Uchikawa et al., 1986b). Die Poly(Ribitphosphat)-Teichonsäure der Serovarietät 7 enthält keine Glycosylreste. Bei den Stämmen der Serotypen 3a, 3b und 3c substituiert α -N-Acetylglucosamin an den C₄-OH-Gruppen der Ribitreste. Eine gleichzeitige Substitution von α -N-Acetylglucosamin am C₄- und α -Rhamnose am C₂-Atom von Ribitresten wurde für die Teichonsäuren der Serotypen 1/2a, 1/2b und 1/2c nachgewiesen. Für *L. monocytogenes* ATCC 15313 (SV 1/2a) wurde gezeigt, daß es sich bei den Rhamnosylsubstituenten um Dimere handelt (Fiedler et al., 1984). Im Falle der Teichonsäure von *L. monocytogenes* Stamm EGD sind die Rhamnosyl-

dimere durch Monomere ersetzt (Kamisango et al., 1983).

Nach den Ergebnissen der detaillierten Strukturanalysen basiert die strukturelle Vielfalt von Teichonsäuren verschiedener *Listeria*-Sero-varietäten, die ursprünglich von Fiedler et al. (1984) nachgewiesen wurde, nicht allein auf einer unterschiedlichen glycosidischen Substitution. Tatsächlich können die Teichonsäuren innerhalb der Gattung *Listeria* in zwei Strukturklassen eingeteilt werden.

Durch den klassischen Poly(Ribitphosphat)-Typ sind, wie erwähnt, *L. monocytogenes*-Stämme der Sero-varietäten 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c und 7 sowie *L. seeligeri* SV 1/2b charakterisiert. Das Vorkommen von Teichonsäuren des Poly-(N-Acetylglucosaminylribitphosphat)-Typs umfaßt die Sero-varietäten 4a, 4c, 4e, 4f, 5, 6a und 6b, mit der Spezies *L. monocytogenes* und den neu beschriebenen Arten *L. innocua*, *L. ivanovii* und *L. welshimeri* (Fiedler und Ruhland, 1987).

Der strukturelle Aufbau von Teichonsäuren verschiedener *Listeria*-Sero-varietäten ist in Abbildung 55 zusammenfassend dargestellt.

Immundoppeldiffusionsexperimente, die in der vorliegenden Arbeit mit Teichonsäuren verschiedener *Listeria*-Serotypen und O-Anti-*Listeria*-Seren durchgeführt wurden, lieferten in keinem Fall eine sichtbare Immunreaktion. Aufgrund dessen sollte jedoch nicht gefolgert werden, daß Teichonsäuren innerhalb der Gattung *Listeria* keine immunologisch aktiven Zelloberflächenkomponenten darstellen. Vielmehr ist anzunehmen, daß der Immundoppeldiffusionstest nach Ouchterlony zum Nachweis der Antigenität von Teichonsäuren ungeeignet ist. Wie mit Hilfe der quantitativen Immunpräzipitation nachgewiesen werden konnte, enthalten O-Anti-*Listeria*-Seren gegen *L. monocytogenes* Stamm EGD und *L. ivanovii* ATCC 19119 Teichonsäure-spezifische Antikörper (Kamisango et al., 1983; Jochmus, 1986). Als immunodominante Epitope der Teichonsäuren wurden die Rhamnosylreste für *L. monocytogenes* Stamm EGD und N-Acetylglucosaminylphosphat für *L. ivanovii* identifiziert.

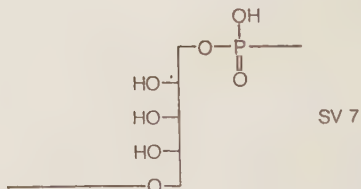
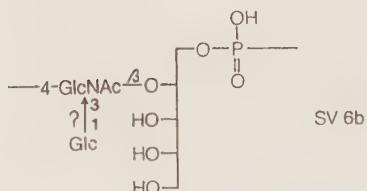
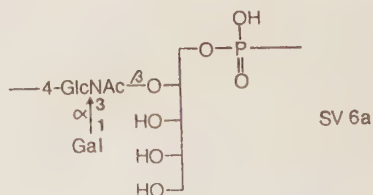
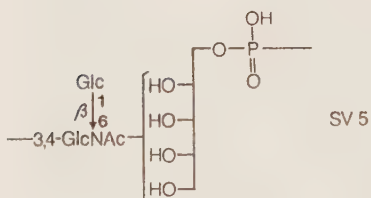
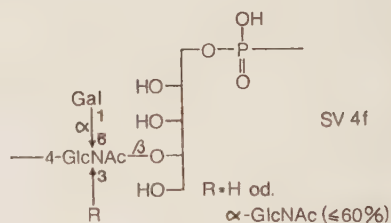
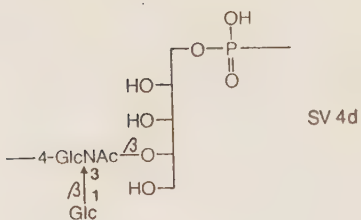
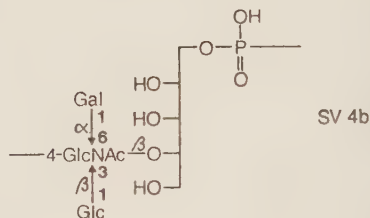
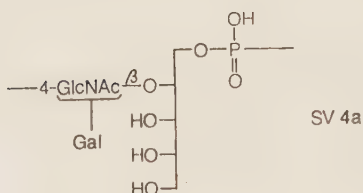
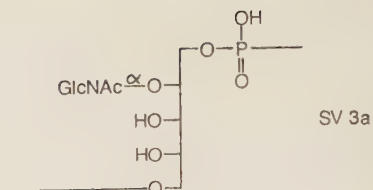
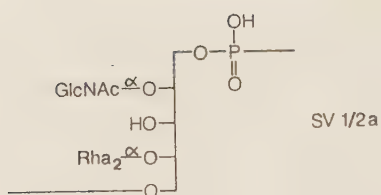


Abbildung 55:

Strukturen der sich wiederholenden Einheiten von Teichonsäuren verschiedener Serovarietäten der Gattung *Listeria*.

Ergebnisse von Präzipitationshemmtests wiesen auf starke Kreuzreaktionen unter den Teichonsäuren von *L. ivanovii*, *L. seeligeri* und *L. monocytogenes* SV 4b hin (Jochmus, 1986). Aufgrund von strukturellen Ähnlichkeiten der Teichonsäuren verschiedener *Listeria*-Serovarietäten (Abbildung 55) sind immunologische Kreuzreaktionen auch in anderen Fällen zu erwarten. Es ist deshalb zu vermuten, daß Teichonsäuren entgegen der ursprünglichen Annahme von Fiedler et al. (1984) keine wesentliche Rolle bei der serologischen Klassifizierung von *Listeria*-Stämmen auf der Basis des Antigenschemas nach Seeliger und Donker-Voet zukommt. Spezifische Antikörper, die gegen strukturell unterschiedliche Epitope der Teichonsäuren gerichtet sind, könnten jedoch trotzdem von Bedeutung für diagnostische Zwecke sein.

Da die Mureine sowie Lipoteichonsäuren aufgrund ihrer strukturellen Identität (Fiedler et al., 1984; Ruhland und Fiedler, 1987) nicht und Teichonsäuren vermutlich nur bedingt für die immunologische Differenzierung von *Listeria*-Serovarietäten in Frage kommen, ist anzunehmen, daß Proteinantigene an der Zelloberfläche von *Listeria*-Stämmen vorhanden sind.

Das Vorkommen von kovalent mit dem Murein verknüpften Proteinen konnte für *L. monocytogenes* ATCC 19115 ausgeschlossen werden. Rohzellwände, die intensiv mit SDS extrahiert worden waren, enthielten nur noch die Peptidoglycan-typischen Aminosäuren.

Um mit der Zelloberfläche assoziierte Proteine nachzuweisen, wurden ganze Zellen verschiedener *Listeria*-Stämme einer SDS-Extraktion (2 % SDS, 5 min, 100 °C) unterzogen. Die Proteinprofile, die bei der SDS-PAGE der Extrakte erhalten wurden, waren jedoch nahezu identisch mit den Gesamtzellproteinmustern (Lamont et al., 1986) und ließen keine Oberflächenspezifischen Proteinbanden erkennen. Rohzellwandpräparate schienen ebenfalls für die Identifizierung von Zelloberflächenproteinen ungeeignet zu sein, da sie offensichtlich

mit Membranresten verunreinigt waren und bei der SDS-PAGE zahlreiche Polypeptidbanden lieferten, die dem Gesamtzellproteinmuster glichen. Die Assoziation von Membranresten mit Zellwänden wurde auch von Mirelman et al. (1971) und Jochmus (1986) beobachtet.

Exoproteine, die möglicherweise antigene, mit der Zelloberfläche assoziierte Komponenten darstellen, konnten auf drei verschiedene Weisen von *Listeria*-Stämmen präpariert werden. Dazu wurden die Organismen auf mit Dialysemembranen bedeckten Agarplatten, als "Dialyseschlauchkulturen" oder in ultrafiltriertem BHI-Medium angezogen. Dabei galt es jeweils höhermolekulare Substanzen, wie zum Beispiel Polypeptide, von den Kulturen fernzuhalten, um reine Exoproteinpräparationen zu ermöglichen.

Zunächst wurden die Exoproteinprofile verschiedener Sero-varietäten von *L. monocytogenes* an Hand der Stämme ATCC 19111 (SV 1/2a), ATCC 19113 (SV 3a), ATCC 19115 (SV 4b) und SLCC 5778 (SV 4b) durch SDS-PAGE verglichen. Alle Stämme, mit Ausnahme von *L. monocytogenes* SLCC 5778, wiesen ein nahezu identisches Exoproteinmuster auf mit einer sehr prominenten Bande im Bereich von 58 kD und zwei weiteren, weniger intensiv angefärbten Banden, denen Molekulargewichte von ungefähr 49 kD und 44 kD zugeordnet werden konnten. Ein 34 kD-Polypeptid war im Fall von *L. monocytogenes* ATCC 19115 bei manchen Präparationen zusätzlich vorhanden. Der avirulente und nicht-hämolytische Stamm *L. monocytogenes* SLCC 5778 lieferte jedoch nur eine schwache Proteinbande bei ca. 49 kD.

Im Vergleich zu den Gesamtzellproteinmustern enthielten die Exoproteinprofile nur eine geringe Anzahl von Banden. Es ist deshalb anzunehmen, daß die in den Kulturüberständen nachgewiesenen Proteine nicht durch lytische Prozesse freigesetzt wurden, sondern tatsächlich Exoproteine darstellten. Dafür sprach auch, daß im Phasenkontrastmikroskop keine Lyse von Bakterienzellen beobachtet werden

konnte und die Kulturüberstände keine Nucleinsäuren in nachweisbaren Mengen enthielten.

Wie Untersuchungen zur Kinetik der Exoproteinproduktion ergaben, werden die extrazellulären Proteine in allen Fällen erst am Ende der exponentiellen bzw. am Anfang der stationären Wachstumsphase von den Zellen sezerniert.

Eine weitere Charakterisierung der Exoproteine der *L. monocytogenes*-Stämme ATCC 19111, ATCC 19113 und ATCC 19115 erfolgte durch isoelektrische Fokussierung. Danach handelt es sich bei den extrazellulären Proteinen generell um saure Polypeptide. Die erhaltenen Bandenmuster ermöglichten keine Differenzierung der *Listeria*-Stämme.

Funktionen und eventuelle enzymatische Aktivitäten der Proteine wurden nicht näher untersucht, jedoch könnte es sich bei den 58 kD-Proteinen um Listeriolysin handeln (Parrisius et al., 1986; Geoffroy et al., 1987; Kathariou et al., 1987). Nicht geklärt ist außerdem, welche Beziehung die Proteine innerhalb eines Bandenmusters zueinander haben, d. h., ob die Proteine Expressionen verschiedener Gene darstellen oder ob die 49 kD- und 44 kD-Polypeptide Modifikationen bzw. proteolytische Abbauprodukte der 58 kD-Proteine sind.

Ein Vergleich der Exoproteinmuster von Stämmen verschiedener *Listeria*-Spezies erfolgte anhand von *L. monocytogenes* SLCC 2482 (SV 7), *L. innocua* ATCC 33090 (SV 6a), *L. innocua* ATCC 33091 (SV 6b), *L. welshimeri* SLCC 5354 (SV 6a), *L. ivanovii* ATCC 19119 (SV 5) und *L. seeligeri* SLCC 3954 (SV 1/2b).

Alle Stämme, mit Ausnahme von *L. seeligeri* und *L. ivanovii*, produzierten unter den angewendeten Bedingungen nachweisbare extrazelluläre Proteine. *L. monocytogenes* SV 7 unterschied sich bezüglich des Exoproteinprofils nicht von den anderen *L. monocytogenes*-Stämmen. Signifikante Unterschiede ergaben sich jedoch bei den Exoproteinmustern von *L. innocua* SV 6a, *L. innocua* SV 6b und *L. welshimeri* SV 6a. Neben einer gemeinsamen Polypeptidbande bei ca. 51 kD konnte für *L. innocua* SV 6a ein 55 kD-, für *L. innocua* SV 6b ein 57 kD- und für *L. welshimeri* SV 6a ein 65 kD-Exoprotein nachgewie-

sen werden. Eine Differenzierung von verschiedenen *Listeria*-Spezies auf der Basis von Exoproteinen scheint demnach möglich zu sein.

Der Nachweis der Antigenität der Exoproteine erfolgte am Beispiel von *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b). Im Immunoblot mit homologem O-Antiserum zeigten das 58 kD- und 44 kD-Polypeptid eine sehr starke Immunreaktion. Eine Reaktion des 49 kD-Proteins war aufgrund der intensiven Schwärzung des Nitrocellulosefilters in der Gegend zwischen der 58 kD- und 44 kD-Bande nicht zu erkennen. Drei weitere Proteine im Molekulargewichtsbereich von 30-40 kD, die durch Proteinfärbung nicht nachweisbar waren, reagierten ebenfalls mit dem Antiserum. Von den zahlreichen Banden des Gesamtzellproteinmusters zeigten nur vier Proteine mit Molekulargewichten von 58, 54, 44 und 38 kD eine Antigen-Antikörper-Reaktion, wobei das 58 kD- und das 44 kD-Protein vermutlich den beiden prominenten Exoproteinen entspricht. Es ist deshalb anzunehmen, daß es sich bei den extrazellulären Proteinen mit einem Molekulargewicht von 58 kD und 44 kD um Oberflächenantigene handelt. Beide Proteine sind jedoch nicht als spezifisch für *L. monocytogenes* der Serovarietät 4b anzusehen, da sie mit heterologem O-Antiserum gegen *L. monocytogenes* der Serovarietät 3a kreuzreagierten.

Möglicherweise sind jedoch die pathogenen *L. monocytogenes*-Stämme auf der Basis von Exoproteinen immunologisch von Vertretern anderer *Listeria*-Spezies unterscheidbar. Zur Klärung dieser Frage sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

"Westernblot"-Analysen von Proteinpräparaten verschiedener *Listeria*-Stämme lieferten vor kurzem Hinweise für das Vorkommen antigener Zelloberflächenproteine (Pec1 und Donachie, 1986; Paquet et al., 1986). Serovarietäten- oder Genus-spezifische Proteine konnten jedoch bisher nicht identifiziert werden. Fünf Proteinantigene wurden von Roussel-Delvallez et al. (1986) für *L. monocytogenes* SV 4b

nachgewiesen. Antonissen et al. (1986) präparierten ein Protein von Fragmenten der Zellhülle von *L. monocytogenes* SV 4b, das eine Allergie vom verzögerten Typ gegen *L. monocytogenes* hervorruft.

Untersuchungen von Jochmus (1986) weisen ebenfalls auf das Vorliegen von antigenen Oberflächenproteinen bei *L. ivanovii* SV 5 hin. Der Nachweis Serovar 5-spezifischer Oberflächenproteine gelang jedoch nicht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß vermutlich weder Teichon- noch Lipoteichonsäuren, sondern Proteinantigene die biochemische Grundlage der serologischen Differenzierung der Gattung *Listeria* darstellen. Exoproteinantigene, die nach den erhaltenen Befunden mit der Zelloberfläche assoziiert sind, könnten dabei von Bedeutung sein. Um die O-antigenen Faktoren, auf denen das serologische Schema nach Seeliger und Donker-Voet (Seeliger und Höhne, 1979) basiert, zu definieren, sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

4.2 Vorkommen, Struktur, taxonomische und phylogenetische Relevanz von Lipoteichonsäuren bei den Gattungen Listeria und Staphylococcus sowie Vertretern anderer Verwandtschaftsgruppen Gram-positiver Bakterien

Wie die Ergebnisse vorliegender und einer vorausgehenden Arbeit (Ruhland, 1984) zeigen, kommen Lipoteichonsäuren bei allen Spezies und verschiedenen Serovarietäten der Gattung *Listeria*, ausgenommen *L. denitrificans* vor (Ruhland und Fiedler, 1986 und 1987; Fiedler und Ruhland, 1987). Das Fehlen von Lipoteichonsäuren bei *L. denitrificans* und die Anwesenheit eines anderen Typs von amphiphilen Polymeren ist ein weiterer Hinweis für die offensichtlich unkorrekte Klassifizierung dieser Spezies innerhalb der Gattung *Listeria* (Fiedler und Seger, 1983; Jones, 1975; Stuart und Welshimer, 1973), die kürzlich als *Jonesia denitrificans* einer neuen Gattung, *Jonesia*, zugeordnet wurde (Rocourt et al., 1987b).

Die einheitliche Grundstruktur der Lipoteichonsäuren weist unter anderem darauf hin, daß es sich bei der Gattung *Listeria* um eine kohärente taxonomische Gruppe handelt. Die Zugehörigkeit der Spezies *L. grayi* und *L. murrayi* zu dieser Gattung wird durch die erhaltenen Resultate unterstützt (Rocourt et al., 1987a). Die Abwesenheit der Galactosyl- und Phosphatidylsubstitution bei den Lipoteichonsäuren von *L. grayi* und *L. murrayi* spiegelt jedoch die etwas entferntere Verwandtschaft dieser beiden Organismen zu den anderen Spezies der Gattung *Listeria* wider (Rocourt et al., 1982).

Die Lipoteichonsäuren von *Listeria*-Stämmen weisen strukturelle Übereinstimmungen mit Lipoteichonsäuren von Vertretern anderer Gattungen Gram-positiver Bakterien auf.

α -D-Galactopyranosylreste als Substituenten von Glycerinphosphateinheiten der Lipoteichonsäuren wurden bei *Lb. fermenti* (Wicken und Knox, 1970) und *Streptococcus*-Stämmen (Fischer et al., 1980a und b), die kürzlich der neuen Gattung *Lactococcus* zugeordnet wurden (Schleifer et al.,

1985), nachgewiesen. *Lb. fermenti* enthält Galactopyranosyl-(α 1-2)Glucopyranosyl(α 1-3)-Diacylglycerin als Glycolipidanker (Wicken und Knox, 1970). Bei den Lipoteichonsäuren von *Lb. casei* und *Lb. helveticus* wurde ein strukturell verwandter Glycolipidanteil der Struktur Glucosyl(β 1-6)Galactosyl-(α 1-2)Glucosyl(α 1-3)-Diacylglycerin identifiziert (Nakano und Fischer, 1978; Fischer et al., 1980a und b).

Glycolipidanker, die sich strukturell von den bei Listerien nachgewiesenen unterscheiden, treten bei Lipoteichonsäuren von *S. aureus* H und Stämmen der Gattungen *Streptococcus* und *Bacillus* auf. Kojibiosyl-Diacylglycerin wurde bei Streptokokken (Ganfield und Pieringer, 1975), Gentiobiosyl-Diacylglycerin bei *S. aureus* H und *Bacillus*-Stämmen gefunden (Duckworth et al., 1975; Fischer et al., 1978).

Das Vorkommen von Lipoteichonsäuren bei Vertretern der Gattung *Listeria* und das gleichzeitige Fehlen dieser amphiphilen Polymere bei coryneformen Bakterien (siehe unten) kann dahingehend bewertet werden, daß Listerien im Bereich der Gattungen *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* und *Lactobacillus* taxonomisch einzuordnen sind. Letztere Organismen gehören dem sogenannten "Clostridien-Ast" von Grampositiven Bakterien an, der durch einen G+C-Gehalt der DNA von unter 50 Mol% charakterisiert ist. Diese phylogenetische Einordnung von Listerien wurde vorausgehend aufgrund von vergleichenden 16S rRNA-Sequenzanalysen vorgeschlagen (Ludwig et al., 1984).

Nach den Ergebnissen vorliegender und vorhergehender Untersuchungen (Ruhland, 1984) scheinen Lipoteichonsäuren bei allen Vertretern der Gattung *Staphylococcus* vorzukommen.

Die bei den Spezies *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. carnosus*, *S. saccharolyticus*, *S. capitis*, *S. cohnii*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. simulans* und *S. warneri* nachgewiesenen Lipoteichonsäuren besitzen die gleichen

Strukturmerkmale wie die Lipoteichonsäure von *S. aureus* H (Abbildung 5). Dies kommt auch in einem nahezu identischen Laufverhalten bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zum Ausdruck.

Die hydrophilen Ketten bestehen jeweils aus 1,3-Phosphodiesterverknüpften Glycerinphosphateinheiten. Die Glycolipidanker der Lipoteichonsäuren entsprechen in allen Fällen Gentiobiosyl-Diacylglycerin [Glc(β 1-6)Glc(β 1-3)Acyl₂Gro]. Strukturelle Variationen von Lipoteichonsäuren in der Gattung *Staphylococcus* betreffen ausschließlich die Substitution der Poly(Glycerinphosphat)-Ketten. Estergebundenes D-Alanin substituiert an Glycerinphosphatresten der Lipoteichonsäuren aller untersuchten Stämme. Die einzige Ausnahme ist *S. cohnii*. Interessanterweise besitzt dieser Organismus zugleich als einziger einer Reihe von *Staphylococcus*-Stämmen, deren Zellwände Poly(Polyolphosphat)-Teichonsäuren aufweisen, eine D-Alanin-freie Zellwandteichonsäure (Endl, 1982). Dies ist in Einklang mit Ergebnissen von Haas et al. (1984), wonach im Fall von *S. aureus* H Lipoteichonsäure als Donator von Alaninresten für die Alanylsubstitution von Zellwandteichonsäure fungiert.

Das Vorkommen von Glucosaminyl(α 1-2)Glycerin in HF-Hydrolysaten der Lipoteichonsäuren von *S. cohnii*, *S. hominis*, *S. saprophyticus* und *S. simulans* wies bei diesen Stämmen auf eine Substitution von Glycerinresten der hydrophilen Ketten mit N-Acetylglucosamin hin. Das Auftreten der N-Acetylglucosaminylsubstitution korrelierte jedoch nicht mit den verschiedenen "Spezies-Gruppen" der Gattung *Staphylococcus* (Schleifer et al., 1979; Kloos, 1980; Kloos und Schleifer, 1981). Im Gegensatz zu den Zellwandteichonsäuren, die bei Staphylokokken eine außerordentliche Strukturvielfalt aufweisen (Endl et al., 1983), unterstreichen Lipoteichonsäuren aufgrund ihrer einheitlichen Grundstruktur die Geschlossenheit der Gattung *Staphylococcus*.

Um ein möglichst umfassendes Bild über die Verbreitung von Lipoteichonsäuren zu erhalten, wurden ausgewählte Vertreter verschiedener taxonomischer Gruppen Gram-positiver Bakterien auf das Vorkommen von amphiphilen Polymeren untersucht. Mit Hilfe der Chromatographie an Octyl-Sepharose CL-4B stand eine Präparationsmethode zur Verfügung, die eine schnelle und saubere Reinigung von Lipoteichonsäuren und anderen amphiphilen Polymeren ermöglicht.

Lipoteichonsäuren des Poly(Glycerinphosphat)-Typs enthalten die Stämme *B. cereus* und *Brochothrix thermosphacta*. Dafür sprechen ein hoher Phosphatgehalt der amphiphilen Polymere, ein Molverhältnis Glycerin zu Phosphat von etwa 1:1 und die Freisetzung von Glycerin durch Behandlung mit 60%iger wässriger Flußsäure (0 °C, 16 h). Als Substituenten von Glycerinresten treten in beiden Fällen estergebundenes D-Alanin, bei *Brochothrix thermosphacta* zusätzlich α -glycosidisch gebundene Glucose auf. Die Zusammensetzung der Lipidanteile wurde nicht näher untersucht, jedoch scheint Glucose in beiden Fällen als einzige Zuckerkomponente vorzukommen.

Durch Phenol/Wasser extrahierbare, an Octyl-Sepharose bindende, polymere Substanzen, bei denen es sich vermutlich nicht um Lipoteichonsäuren, sondern um Lipoglycane handelt, sind bei *Aerococcus viridans* und *Mycobacterium phlei* vorhanden. Die amphiphilen Substanzen dieser Stämme zeichnen sich durch einen geringen Phosphat-, jedoch hohen Neutralzuckergehalt aus. Als Komponenten wurden Galactose, Glucose und Galactosamin (oder Mannosamin) bei *Aerococcus viridans* sowie Ribose und Mannose bei *Mycobacterium phlei* identifiziert.

Keine amphiphilen Polymere konnten bei *B. acidocaldarius*, *B. macerans*, *Deinococcus radiodurans* und *Oerskovia turbata* nachgewiesen werden. Das Fehlen von amphiphilen Polymeren bei *B. acidocaldarius* und *B. macerans* zeigt, daß die Gattung *Bacillus* im Gegensatz zu den Gattungen *Listeria* und *Staphylococcus* bezüglich des Vorkommens von Lipoteichonsäure keine kohärente taxonomische Gruppe darstellt.

Nach den hier erhaltenen Ergebnissen und den Resultaten früherer Untersuchungen (Ruhland, 1984) scheinen Lipoteichonsäuren unter Gram-positiven Bakterien nicht soweit verbreitet zu sein, wie ursprünglich angenommen wurde (Toon et al., 1972; Powell et al., 1975). Die bisher über das Vorkommen von Lipoteichonsäuren und anderen amphiphilen Polymeren (Lipoglycanen) bei verschiedenen Gattungen Gram-positiver Bakterien vorliegenden Daten sind anhand eines Bakterienstammbaumes in Abbildung 56 dargestellt. Dieser Stammbaum basiert auf vergleichenden 16S rRNA-Sequenzanalysen und trennt die Gram-positiven Bakterien in zwei Hauptäste auf (Fox et al., 1980; Woese, 1987).

Interessanterweise zeichnen sich Vertreter des "Actinomyceten-Astes" (G+C-Gehalt > 55 Mol%) durch das Vorkommen von Lipoglycanen aus, während Lipoteichonsäuren in diesem phylogenetischen Bereich offenbar fehlen. Bei Organismen des "Clostridien-Astes" (G+C-Gehalt < 50 Mol%) hingegen kommen nach bisherigen Erkenntnissen mit Ausnahme von *Aerococcus viridans* nur Lipoteichonsäuren vor. Bei der Gattung *Aerococcus* handelt es sich jedoch um eine phylogenetische Gruppierung, die schon frühzeitig vom Stammbaum abzweigt. Das Vorkommen von Lipoteichonsäuren und Lipoglycanen spiegelt demnach offensichtlich die 16S rRNA-Phylogenie Gram-positiver Bakterien wider. Eine Ausnahme dieser mikrobiologisch bemerkenswerten Aussage stellt jedoch der Stamm *Streptomyces laevis* K-3056 dar, der nach Angaben von Potekhina et al. (1983) Lipoteichonsäure enthalten soll. Es sind deshalb weitere zuverlässige Daten notwendig, um die angedeutete Phylogenie von Lipoteichonsäuren zu erhärten.

Im Gegensatz zu Lipoteichonsäuren sind Teichonsäuren jedoch sowohl bei Organismen des "Actinomyceten-Astes" (z.B. *Brevibacterien* und Stämme der "*Arthrobacter nicotianae*-Gruppe") als auch Vertretern des "Clostridien-Astes" (z. B. *Staphylokokken* und *Listerien*) weit verbreitet (Fiedler et al., 1981; Fiedler und Schäffler, 1987; Endl et al., 1983; Fiedler et al., 1984).

Abbildung 56: (Seite 206)

Vorkommen von Lipoteichonsäuren und anderen amphiphilen Polymeren (Lipoglycanen) bei Gram-positiven Bakterien.

Der Bakterienstammbaum (zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Dr. E. Stackebrandt, Universität Kiel; nicht veröffentlicht) basiert auf vergleichenden 16S rRNA-Sequenzanalysen (Fox et al., 1980; Ludwig et al., 1984; Stackebrandt et al., 1980 und 1987; Woese, 1987).

Gattungen mit Spezies, die Lipoteichonsäuren enthalten, wurden mit einer durchgehenden Linie, Gattungen mit Vertretern, die vermutlich Lipoglycane besitzen, mit einer unterbrochenen Linie gekennzeichnet. Bei Gattungen, die mit einem Punkt markiert sind, wurden bisher keine amphiphilen Polymere nachgewiesen.

*Bei Brevibakterien wurden bislang keine Lipoteichonsäuren vorgefunden (pers. Angabe Prof. Dr. F. Fiedler; Dr. P. Nordmann, nicht veröffentlichte Ergebnisse).

Referenzen:

- (1), vorliegende Arbeit;
- (2), Ruhland, 1984;
- (3), Powell et al., 1975;
- (4), Wicken et al., 1978;
- (5), Steppich, 1985;
- (6), Fischer, 1987;
- (7), Duckworth et al., 1975;
- (8), Hether und Jackson, 1983;
- (9), Uchikawa et al., 1986a;
- (10), Fischer et al., 1978;
- (11), Iwasaki et al., 1986;
- (12), Fischer et al., 1980a;
- (13), Toon et al., 1972;
- (14), Ganfield und Pieringer, 1975;
- (15), Nakano und Fischer, 1978;
- (16), Wicken und Knox, 1970;
- (17), Lederer, 1985

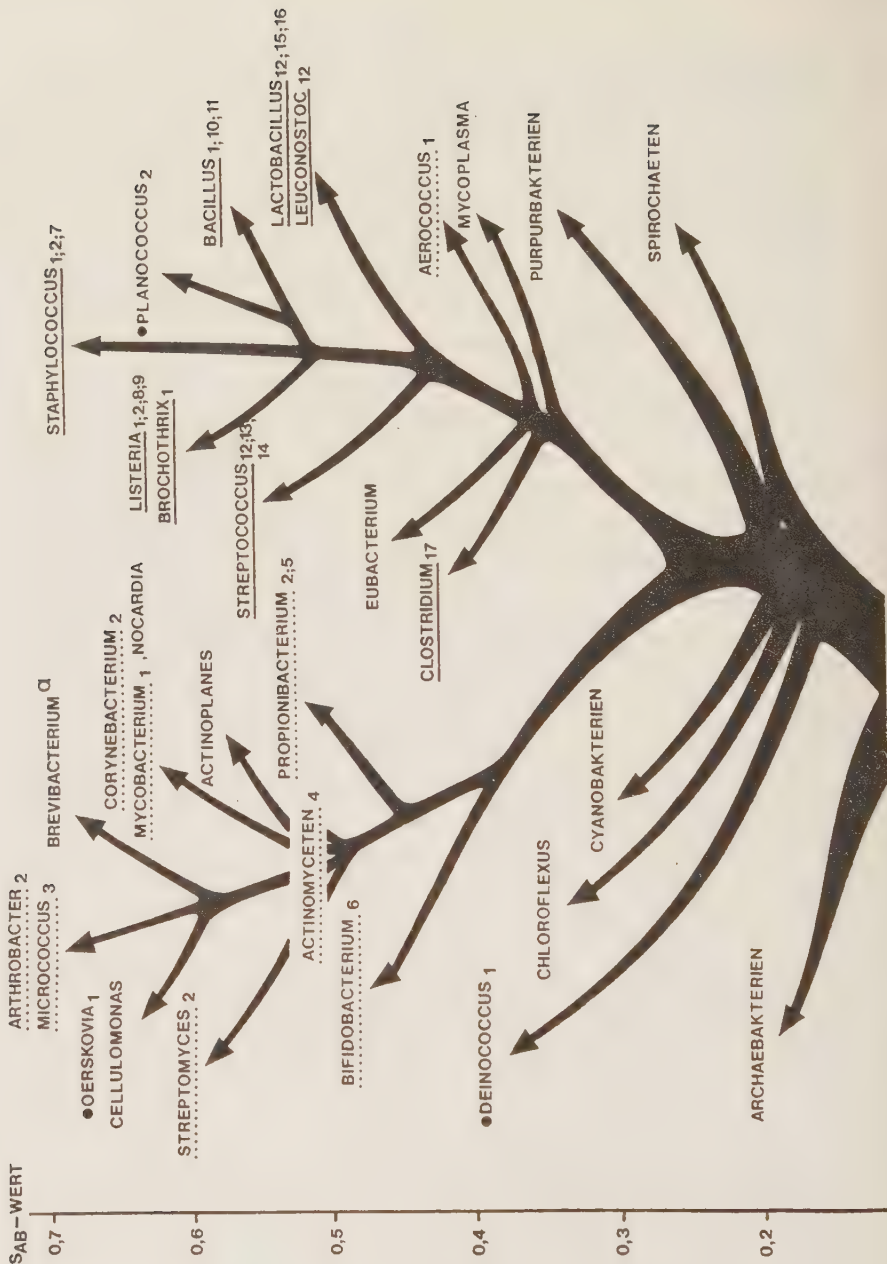


Abbildung 56:

(Legende: Seite 205)

4.3 Einfluß von veränderten Wachstumsbedingungen auf die Zusammensetzung der Zelloberfläche von Listerien und Staphylokokken

Wie einleitend erwähnt, synthetisiert *B. subtilis* var. *niger* unter Phosphatmangel Teichuronsäure anstelle von Teichonsäure (Ellwood und Tempest, 1969 und 1972). Unter diesem Aspekt wurde in vorliegender Arbeit *L. monocytogenes* ATCC 19115 (SV 4b) exemplarisch für die Gattung *Listeria* auf das Vorkommen und die biochemische Zusammensetzung von anionischen Polymeren der Zellwand und der Cytoplasmamembran bei Anzucht unter Phosphat-limitierten Bedingungen untersucht.

Um ein Wachstum von *L. monocytogenes* bei exakt definierten Phosphatkonzentrationen zu ermöglichen, wurde ein synthetisches Medium (MOPSS_{suppl.}-Medium) verwendet. Stämme, die unterschiedliche Spezies der Gattung *Listeria* repräsentierten, zeigten auf diesem Medium, mit Ausnahme von *L. seeligeri* und *L. ivanovii*, ein relativ gutes Wachstum.

Zellen von *L. monocytogenes* ATCC 19115, die in MOPSS_{suppl.}-Medium unter Phosphatmangelbedingungen (1,5 mM Phosphat) angezogen wurden, unterschieden sich in der Zusammensetzung der Zelloberfläche nicht von Zellen, die auf BHI-Medium gewachsen waren. Dies betraf sowohl den Teichonsäure- und Lipoteichonsäuregehalt der Zellen als auch die biochemische Zusammensetzung beider Polymere.

Ein Umschalten von Teichonsäure- auf Teichuronsäurebiosynthese bei Wachstum von *L. monocytogenes* ATCC 19115 unter limitierten Phosphatkonzentrationen erfolgte nicht.

Weitere Untersuchungen über den Einfluß von Wachstumsbedingungen auf die Zusammensetzung der Zellhülle von Listerien wurden bisher nicht durchgeführt. Insbesondere fehlen Daten zur Biochemie der Zelloberfläche von *L. monocytogenes* unter "in vivo"-Verhältnissen bei Infektionen. Da die bakterielle Zelloberfläche einerseits in vielerlei Hinsicht an Virulenzmechanismen beteiligt sein kann (Smith, 1977), andererseits phänotypischen Veränderungen unterliegt (Brown und Williams,

1985), könnten solche Daten von medizinischer Bedeutung sein.

Veränderungen, die Zusammensetzung und Morphologie der Zelloberfläche betreffend, konnten in vorliegender Arbeit für Staphylokokken bei Anzucht unter angenäherten "in vivo"-Bedingungen nachgewiesen werden. Ein Vergleich der Zellwandzusammensetzung wurde an vier verschiedenen *S. aureus*-Stämmen sowie *S. epidermidis* und *S. xylosus* nach Wachstum in Human-Blutplasma und HD-Medium durchgeführt.

Zellen, die in Human-Blutplasma angezogen wurden, zeichneten sich im Vergleich zu den entsprechenden "in vitro"-Kontrollen (Wachstum in HD-Medium) durch ein um ca. 60-70 % geringer quervernetztes Peptidoglycan aus. Dies war dadurch angezeigt, daß einerseits Interpeptidbrücken fehlten, andererseits vorhandene Peptidbrücken nicht an der Quervernetzung beteiligt waren. Der geringe Quervernetzungsgrad des Peptidoglycans bei Wachstum der Zellen unter angenäherten "in vivo"-Bedingungen war durch einen Glycinmangel im Human-Blutplasma bedingt.

Der Anteil von Teichonsäuren in den Zellwänden variierte ebenfalls in Abhängigkeit von den Anzuchtbedingungen. Im Fall von *S. aureus* DSM 20231 bestand die Zellwand von "in vitro" angezogenen Zellen zu ca. 60 Gew.% aus Peptidoglycan und zu ca. 40 Gew.% aus Teichonsäure, während bei Zellen, die unter "in vivo"-ähnlichen Bedingungen kultiviert wurden, das umgekehrte Verhältnis vorlag (nur 40 Gew.% Peptidoglycan gegenüber 60 Gew.% Teichonsäure).

Das Peptidoglycan/Teichonsäure-Verhältnis ist demnach nicht fixiert, sondern unterliegt phänotypischen Variationen, die möglicherweise durch das langsame Wachstum der Zellen unter "in vivo"-Bedingungen, Nährstoffmangel oder antimikrobielle Faktoren des Blutplasmas hervorgerufen werden.

Es ist zu vermuten, daß die bei Anzucht von Staphylokokken unter angenäherten "in vivo"-Bedingungen nachgewiesenen Zellwandveränderungen auch bei Infektionen auftreten und von Relevanz für die Pathogenität der Mikroorganismen sind.

Während einerseits ein vergrößerter Teichonsäureanteil möglicherweise einen erhöhten Schutz der Zellen vor Phagocytose bietet, weisen andererseits Zellwände mit einem signifikant geringer quervernetzten Peptidoglycan eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber Zellwand-lytischen Enzymen auf (Archibald und Heckels, 1975). Eine erhöhte Sensibilität der Zellen gegenüber Penicillin ist aufgrund der labilen Peptidoglycanstruktur ebenfalls zu erwarten.

Um zu untersuchen, inwieweit mit den biochemischen auch morphologische Veränderungen an der Zelloberfläche von Staphylokokken bei Wachstum unter "in vivo"-ähnlichen Verhältnissen einhergehen, wurden am Beispiel von *S. aureus* DSM 20231, *S. epidermidis* DSM 20044 und *S. xylosus* DSM 20266 elektronenmikroskopische Studien durchgeführt.

Costerton et al. (1987) beobachteten kürzlich Zellwandveränderungen bei Wachstum von Staphylokokken "in situ" im Fall von experimenteller Osteomyelitis. Zellen, die unter diesen Bedingungen gewachsen waren, zeichneten sich durch wesentlich verstärkte und unregelmäßig dicke Zellwände sowie eine defekte Septenbildung aus. Ähnliche Effekte treten auch bei Anzucht von Staphylokokken in Anwesenheit von subinhibitorischen Antibiotikakonzentrationen auf (Lorian, 1975).

Staphylokokken-Zellen, die auf dem Antibiotika-freien Human-Blutplasma angezogen wurden, wiesen hingegen keinerlei morphologische Defekte auf, waren jedoch im Gegensatz zu den "in vitro" gewachsenen Zellen von auffälligen Zellwandauflagerungen umgeben. Es stellte sich heraus, daß diese "Kapsel-ähnlichen" Auflagerungen aus Human-Blutplasmaproteinen bestanden, da sie bereits nach kurzzeitiger Inkubation der Zellen in Blutplasma auftraten und zudem sensitiv gegenüber Proteinase waren.

Die Spezifität der Adhäsion der Plasmaproteine wurde bisher nicht untersucht. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, welche Komponenten der Zelloberfläche für die Proteinauflagerungen verantwortlich sind und welche Proteine des

Blutplasmas an die Zellen binden. Zur Klärung dieser Fragen sollte das Phänomen der Adhäsion von Plasmaproteinen an bakterielle Zelloberflächen mit verschiedenen anderen Organismen (z. B. Gram-negative Bakterien), definierten Plasmaproteinen und Human-Blutserum untersucht werden. Die Anwendung von Antikörpern, die gegen spezifische Plasmaproteinkomponenten gerichtet sind, könnte dabei ebenfalls hilfreich sein. Zellgebundene Koagulase ("clumping factor") und Protein A scheinen jedoch für die Adhäsion der Plasmaproteine nicht von entscheidender Bedeutung zu sein, da die Proteinauflagerungen nicht nur bei dem Koagulase- und Protein A-positiven Stamm *S. aureus* DSM 20231, sondern auch bei den Koagulase- und Protein A-negativen Stämmen *S. epidermidis* DSM 20044 und *S. xylosus* DSM 20266 auftraten. Die Anlagerung von wirtseigenen Proteinen an die bakterielle Zelloberfläche wurde auch in einigen anderen Fällen beobachtet. Im Fall von Fibronektin konnte eine spezifische Anheftung über ein Rezeptorprotein für verschiedene *S. aureus*-Stämme nachgewiesen werden (Ryden et al., 1983; Fröman et al., 1987).

Sc. mutans-Stämme sind in der Lage, verschiedene menschliche Speichelproteine an der Zelloberfläche zu binden. Dazu gehören zum Beispiel Agglutinine (Ericson et al., 1984), Amylase (Douglas, 1983), sekretorisches Immunglobulin A (Brandtzaeg et al., 1968), Fibronektin (Ericson und Tynelius-Bratthall, 1986) und β -Mikroglobulin (Ericson et al., 1987).

Möglicherweise könnte das hier bei Wachstum von Staphylokokken unter angenäherten "in vivo"-Bedingungen beobachtete Phänomen der Anheftung von Plasmaproteinen an die Zelloberfläche unter Ausbildung "Kapsel-ähnlicher" Strukturen von Bedeutung für die Virulenz pathogener Bakterien bei Infektionen sein. Denkbar wäre, daß diese "Plasmaproteinkapseln" die Bakterienzellen einerseits vor Phagocytose, andererseits vor Erkennung durch das Immunsystem des Wirtsorganismus schützen.

Wie hier am Beispiel von Staphylokokken gezeigt werden konnte, ist die Zusammensetzung der Zelloberfläche von Bakterien in Abhängigkeit von den Anzuchtbedingungen weitgehenden Veränderungen unterworfen. Daten zur Biochemie und Morphologie der Zelloberfläche, die bei "in vitro"-Kultivierung der Organismen erhalten werden, sind artifiziell und können deshalb nur sehr eingeschränkt auf "in vivo"-Verhältnisse (z. B. Infektionen) übertragen werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Um Serovarietäten-spezifische Antigene in der Gattung *Listeria* zu identifizieren, wurde die Zelloberfläche verschiedener *Listeria*-Stämme biochemisch und immunologisch näher charakterisiert.

Lipoteichonsäuren sind die einzigen amphiphilen Polymere, die bei allen Spezies und unterschiedlichen Serovarietäten dieser Gattung vorkommen. Der hydrophile Anteil der Lipoteichonsäuren besteht jeweils aus einer Poly(Glycerinphosphat)-Kette, deren Glycerinreste zum Teil mit estergebundenem D-Alanin (21-36 %) oder α -Galactose (11-33 %) substituiert sind. Den Lipidanteil bilden Gal(α 1-2)Glc(α 1-3)Acyl₂Gro oder Phosphatidyl-Gal(α 1-2)Glc(α 1-3)Acyl₂Gro. Die Galactosyl- und Phosphatidylsubstitution fehlt jedoch bei den Lipoteichonsäuren von *L. murrayi* und *L. grayi*. Nach den Ergebnissen von Immundoppeldiffusionsexperimenten stellen Lipoteichonsäuren in der Gattung *Listeria* somatische Antigene dar, die jedoch aufgrund ihrer einheitlichen Struktur nicht zur serologischen Differenzierung beitragen.

Teichonsäuren, bei denen es sich ebenfalls um wichtige Oberflächenantigene handelt, wurden am Beispiel von *L. monocytogenes* SV 4b sowie *L. innocua* SV 6a und 6b strukturell eingehender untersucht. Sie bestehen in allen Fällen aus Poly(N-Acetylglucosaminylribitphosphat)-Ketten, wobei Galactose (SV 6a), Glucose (SV 6b) oder Galactose und Glucose (SV 4b) jeweils am N-Acetylglucosamin substituieren. Aufgrund von strukturellen Übereinstimmungen bei Teichonsäuren verschiedener *Listeria*-Serovarietäten spielen diese Polymere wahrscheinlich keine wesentliche Rolle bei der serologischen Klassifizierung der Vertreter der Gattung *Listeria*. Es ist deshalb anzunehmen, daß die Serotypisierung von Listerien vornehmlich auf Proteinantigenen basiert. Im Fall von *L. monocytogenes* SV 4b konnten Exoproteine mit Molekulargewichten von ca. 58 und 44 kD identifiziert werden, die Oberflächenantigene darstellen. Verschiedene Spezies der

Gattung *Listeria* können auf der Basis der Exoproteine unterschieden werden. Bei einigen Exoproteinen handelt es sich möglicherweise um Art- oder Serotypen-spezifische Antigene.

Untersuchungen zum Vorkommen von Lipoteichonsäuren bei den Gattungen *Listeria* und *Staphylococcus* sowie Vertretern anderer Verwandtschaftsgruppen Gram-positiver Bakterien ermöglichen Aussagen zur Verbreitung sowie zur taxonomischen und phylogenetischen Relevanz dieser amphiphilen Polymere. Nach den erhaltenen Befunden ist das Vorkommen von Lipoteichonsäuren auf Organismen beschränkt, die dem "Clostridien-Ast" Gram-positiver Bakterien angehören und spiegelt offensichtlich die "16S rRNA-Phylogenie" wider.

Lipoteichonsäuren scheinen bei allen Vertretern der Gattung *Staphylococcus* vorzukommen. Aufgrund ihrer einheitlichen Grundstruktur unterstreichen sie wie im Fall von *Listerien* die Kohärenz dieser Gattung. Sie bestehen jeweils aus einer Poly(Glycerinphosphat)-Kette, die kovalent mit Gentiobiosyl-Diacylglycerin [Glc(β1-6)Glc(β1-3)Acyl₂Gro] verknüpft ist. Estergebundenes D-Alanin substituiert in allen Fällen, ausgenommen *S. cohnii*, an Glycerinresten der hydrophilen Kette der Lipoteichonsäuren. Bei den Stämmen *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. simulans* und *S. cohnii* tritt α-glycosidisch gebundenes N-Acetylglucosamin als weiterer Substituent auf.

Der Einfluß von Wachstumsbedingungen auf die Zusammensetzung und Struktur der Zelloberfläche von Bakterien wurde am Beispiel von *Listerien* und *Staphylokokken* untersucht.

Bei Anzucht von *L. monocytogenes* in einem synthetischen Medium unter Phosphatmangel konnten keine Veränderungen an der Zelloberfläche festgestellt werden; ein Umschalten von Teichonsäure- auf Teichuronsäuresynthese erfolgte nicht. *Staphylokokken*, die unter angenäherten "in vivo"-Bedingungen in Human-Blutplasma kultiviert wurden, wiesen jedoch im Vergleich zu "in vitro"-angezogenen Stämmen wesentliche

biochemische Veränderungen an der Zelloberfläche auf, die möglicherweise von Bedeutung für die Pathogenität dieser Organismen im Fall von Infektionen sind. Unter "in vivo"-ähnlichen Verhältnissen angezogene Zellen waren von charakteristischen Zellwandauflagerungen, die aus Plasmaproteinen bestanden, umgeben und zeichneten sich durch ein um 60-70 % geringer quervernetztes Murein sowie ein deutlich erhöhtes Teichonsäure/Peptidoglycan-Verhältnis aus.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Adams JB, Archibald AR, Baddiley J, Coapes HE und Davison AL (1969): Teichoic acids possessing phosphate-sugar linkages in strains of *Lactobacillus plantarum*. *Biochem. J.* 113, 191-193
- Albersheim JW, Nevins DJ, English PD und Karr A (1967): A method for the analysis of sugars in plant cell wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr. Res.* 5, 340-345
- Ames BN und Dubin DT (1960): The role of polyamines in the neutralization of bacteriophage deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 235, 769-775
- Anderton WJ und Wilkinson SG (1980): Evidence for the presence of a new class of teichoic acid in the cell wall of bacterium NCTC 9742. *J. Gen. Microbiol.* 118, 343-351
- Anderton WJ und Wilkinson SG (1985): Structural studies of a mannitol teichoic acid from the cell wall of bacterium N.C.T.C. 9742. *Biochem. J.* 226, 587-599
- Antonissen ACJM, Lemmens PJMR, van den Bosch JF und van Boven CPA (1986): Purification of a delayed hypersensitivity-inducing protein from *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* 34, 91-95
- Archibald AR und Heckels JE (1975): Alterations in the composition and bacteriophage-binding properties of walls of *Staphylococcus aureus* H grown in continuous culture in simplified defined media. *Biochim. Biophys. Acta* 406, 60-67
- Archibald AR und Coapes HE (1976): Bacteriophage SP50 as a marker for cell wall growth in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 125, 1195-1206
- Armstrong JJ, Baddiley J, Buchanan JG, Carrs B und Greenberg GR (1958): Isolation and structure of ribitol phosphate derivatives (teichoic acids) from bacterial cell walls. *J. Chem. Soc.*, 4344-4354
- Armstrong JJ, Baddiley J, Buchanan JG, Davison AL, Kelemen MV und Neuhaus FC (1959): Teichoic acids from bacterial walls. Composition of teichoic acids from a number of bacterial walls. *Nature (London)* 184, 247-248
- Armstrong JJ, Baddiley J und Buchanan JG (1961): Further studies on the teichoic acid from *Bacillus subtilis* walls. *Biochem. J.* 80, 254-261
- Baddiley J und Davison AL (1961): The occurrence and location of teichoic acids in lactobacilli. *J. Gen. Microbiol.* 24, 295-299

- Baddiley J, Buchanan JG, Hardy FE, Martin RO, RajBhandary UL und Sanderson AR (1961): The structure of the ribitol teichoic acid of *S. aureus* H. *Biochim. Biophys. Acta* 52, 406-407
- Baddiley J, Buchanan JG, RajBhandary UL und Sanderson AR (1962): Teichoic acids from the walls of *Staphylococcus aureus* H. 1. Structure of the N-acetylglucosaminylribitol residues. *Biochem. J.* 82, 439-448
- Berche P, Gaillard JL und Sansonetti PJ (1987): Intracellular growth of *Listeria monocytogenes* as a prerequisite for in vivo induction of T cell-mediated immunity. *J. Immunol.* 138, 2266-2271
- Bergmeyer HU (1974): Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim
- Blumenkrantz N und Asboe-Hansen G (1973): New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 54, 484-489
- Bolton RW (1980): Adherence of oral streptococci to hydroxyapatite in vitro via glycerol-teichoic acid. *Arch. Oral Biol.* 25, 111-114
- Brade H, Galanos C und Lüderitz O (1983): Differential determination of the 3-deoxy-D-mannoctulosonic acid residues in lipopolysaccharides of *Salmonella minnesota* rough mutants. *J. Biochem.* 131, 195-200
- Brandtzaeg P, Fjellanger I und Gjeruldsen ST (1968): Adsorption of immunoglobulin A onto oral bacteria in vivo. *J. Bacteriol.* 96, 242-249
- Briles EB und Tomasz A (1973): Pneumococcal forssman antigen. A choline-containing lipoteichoic acid. *J. Biol. Chem.* 248, 6394-6397
- Brown MRW und Williams P (1985): The influence of environment on envelope properties affecting survival of bacteria in infections. *Ann. Rev. Microbiol.* 39, 527-556
- Brubaker RR (1985): Mechanisms of bacterial virulence. *Ann. Rev. Microbiol.* 39, 21-50
- Brundish DE und Baddiley J (1968): Pneumococcal C-substance, a ribitol teichoic acid containing choline phosphate. *Biochem. J.* 110, 573-582
- Button D und Hemmings NL (1976): Teichoic acids and lipids associated with the membrane of a *Bacillus licheniformis* mutant and the membrane lipids of the parental strain. *J. Bacteriol.* 128, 149-156

- Campbell PA, Rodriguez GE und Schuffler C (1975): *Listeria* cell wall fraction: adjuvant activity in vivo and in vitro. *Cell. Immunol.* 17, 418-422
- Campbell PA, Caldwell JE und Hartman AL (1979): Use of a macrophage cytotoxicity system to show macrophage activation by *Listeria monocytogenes* cell wall fraction. *Scand. J. Immunol.* 10, 1-9
- Costerton JW, Lambe DW, Mayberry-Carson KJ und Tober-Meyer B (1987): Cell wall alterations in staphylococci growing in situ in experimental osteomyelitis. *Can. J. Microbiol.* 33, 142-150
- Davison AL und Baddiley J (1964): Glycerol teichoic acids in walls of *Staphylococcus epidermidis*. *Nature (London)* 202, 874
- De Boer WR, Wouters JTM, Anderson AJ und Archibald AR (1978): Further evidence for the structure of the teichoic acids from *Bacillus stearothermophilus* B65 and *Bacillus subtilis* var. *niger* WM. *Eur. J. Biochem.* 85, 433-436
- Dobson BC und Archibald AR (1978): Effect of specific growth limitations on cell wall composition of *Staphylococcus aureus* H. *Arch. Microbiol.* 119, 295-301
- Donker-Voet J (1972): *Listeria monocytogenes*: some biochemical and serological aspects. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* 19, 287-291
- Douglas CWI (1983): The binding of human salivary alpha-amylase by oral strains of streptococcal bacteria. *Arch. Oral Biol.* 28, 567-573
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA und Smith F (1956): Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356
- Dubray G und Bezard G (1982): A highly sensitive periodic acid-silver stain for 1,2-diol groups of glycoproteins and polysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 119, 325-329
- Duckworth M, Archibald AR und Baddiley J (1975): Lipoteichoic acid and lipoteichoic acid carrier in *Staphylococcus aureus* H. *FEBS Lett.* 53, 176-179
- Dzandu JK, Deh ME, Barratt DL und Wise GE (1984): Detection of erythrocyte membrane proteins, sialoglycoproteins, and lipids in the same polyacrylamide gel using a double-staining technique. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1733-1737

- Ellen RP und Gibbons RJ (1972): M protein-associated adherence of *Streptococcus pyogenes* to epithelial surfaces: prerequisite for virulence. *Infect. Immun.* 5, 826-830
- Ellwood DC und Tempest DW (1969): Control of teichoic acid and teichuronic acid biosyntheses in chemostat cultures of *Bacillus subtilis* var. *niger*. *Biochem. J.* 111, 1-5
- Ellwood DC und Tempest DW (1972): Effects of environment on bacterial wall content and composition. *Adv. Microbiol. Physiol.* 7, 83-117
- Endl J (1982): Chemische und serologische Untersuchung der Zellwand-Teichonsäuren von Staphylokokken. Dissertation, Technische Universität München
- Endl J, Seidl HP, Fiedler F und Schleifer KH (1983): Chemical composition and structure of cell wall teichoic acids of staphylococci. *Arch. Microbiol.* 135, 215-223
- Engelhardt H (1988): Bakterielle Surface-Layer. Zweidimensionale Proteinkristalle als äußere Zellwandschicht von Eu- und Archaeobakterien. *Forum Mikrobiologie* 3, 64-73
- Ericson T, Olsson J, Bowen W, Ciardi J und Rundegren J (1984): Effect of a purified human salivary agglutinin on the adsorption of *S. mutans* to hydroxyapatite. In: *Bacterial Adhesion and Preventive Dentistry* (Cate JM, Leach SA, and Arends J, eds.), IRL Press, Oxford, England, 63-71
- Ericson D und Tynelius-Bratthall (1986): Absorption of fibronectin from human saliva by strains of oral streptococci. *Scand. J. Dent. Res.* 95, 377-379
- Ericson D, Ellen RP und Buivids I (1987): Labeling of binding sites for β_2 -microglobulin (β_2m) on nonfibrillar surface structures of mutans streptococci by immunogold and β_2m -gold electron microscopy. *J. Bacteriol.* 169, 2507-2515
- Fiedler F und Glaser L (1974a): The synthesis of polyribitol phosphate. I. Purification of polyribitol phosphate polymerase and lipoteichoic acid carrier. *J. Biol. Chem.* 249, 2684-2689
- Fiedler F und Glaser L (1974b): The synthesis of polyribitol phosphate. II. On the mechanism of polyribitol phosphate polymerase. *J. Biol. Chem.* 249, 2690-2695
- Fiedler F (1981): On the participation of lipoteichoic acid in the biosynthesis of wall teichoic acids. In: *Chemistry and Biological Activities of Bacterial Surface Amphiphiles* (Shockman GD and Wicken AJ, eds.), Academic Press, New York, 195-208

- Fiedler F, Schäffler MJ und Stackebrandt E (1981): Biochemical and nucleic acid hybridisation studies on *Brevibacterium linens* and related strains. Arch. Microbiol. 129, 85-93
- Fiedler F und Seger J (1983): The murein types of *Listeria grayi*, *Listeria murrayi* and *Listeria denitrificans*. Syst. Appl. Microbiol. 4, 444-450
- Fiedler F und Steber J (1984): Structure and biosynthesis of teichoic acids in the cell walls of *Staphylococcus xylo-sus* DSM 20266. Arch. Microbiol. 138, 321-328
- Fiedler F, Seger J, Schrettenbrunner A und Seeliger HPR (1984): The biochemistry of murein and cell wall teichoic acids in the genus *Listeria*. Syst. Appl. Microbiol. 5, 360-376
- Fiedler F und Draxl R (1986): Biochemical and immunochemical properties of the cell surface of *Renibacterium salmoninarum*. J. Bacteriol. 168, 799-804
- Fiedler F und Ruhland GJ (1987): Structure of *Listeria monocytogenes* cell walls. Bull. Inst. Pasteur 85, 287-300
- Fiedler F und Schäffler MJ (1987): Teichoic acids in cell walls of strains of the "nicotianae" group of *Arthrobacter*: a chemotaxonomic marker. Syst. Appl. Microbiol. 9, 16-21
- Finn TM, Arbuthnott JP und Dougan G (1982): Properties of *Escherichia coli* grown in vivo using a chamber implant system. J. Gen. Microbiol. 128, 3083-3091
- Fischer W (1977): The polar lipids of group B streptococci. I. Glucosylated diphosphatidylglycerol, a novel glycopospholipid. Biochim. Biophys. Acta 487, 74-88
- Fischer W, Laine RA und Nakano M (1978): On the relationship between glycerophosphoglycolipids and lipoteichoic acids in Gram-positive bacteria. II. Structures of glycerophosphoglycolipids. Biochim. Biophys. Acta 528, 298-308
- Fischer W und Rösel P (1980): The alanine ester substitution of lipoteichoic acid (LTA) in *Staphylococcus aureus*. FEBS Lett. 119, 224-226
- Fischer W, Koch HU, Rösel P, Fiedler F und Schmuck L (1980a): Structural requirements of lipoteichoic acid carrier for recognition by the poly(ribitol phosphate) polymerase from *Staphylococcus aureus* H. J. Biol. Chem. 255, 4550-4556
- Fischer W, Koch HU, Rösel P und Fiedler F (1980b): Alanine ester-containing native lipoteichoic acids do not act as lipoteichoic acid carrier. J. Biol. Chem. 255, 4557-4562

- Fischer W (1981): Glycerophosphoglycolipids presumptive biosynthetic precursors of lipoteichoic acids. In: Chemistry and Biological Activities of Bacterial Surface Amphiphiles (Shockman GD and Wicken AJ, eds.), Academic Press, New York, 209-228
- Fischer W und Koch HU (1981): Alanine ester substitution and its effect on the biological properties of lipoteichoic acids. In: Chemistry and Biological Activities of Bacterial Surface Amphiphiles (Shockman GD and Wicken AJ, eds.), Academic Press, New York, 181-194
- Fischer W, Röseler P und Koch HU (1981): Effect of alanine ester substitution and other structural features of lipoteichoic acids on their inhibitory activity against autolysins of *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 146, 467-475
- Fischer W, Koch HU und Haas R (1983): Improved preparation of lipoteichoic acids. Eur. J. Biochem. 133, 523-530
- Fischer W (1987): "Lipoteichoic acid" of *Bifidobacterium bifidum* subspecies *pennsylvanicum* DSM 20239. A lipoglycan with monoglycerophosphate side chains. Eur. J. Biochem. 165, 639-646
- Fischer W, Bauer W und Feigel M (1987): Analysis of the lipoteichoic-acid-like macroamphiphile from *Bifidobacterium bifidum* subspecies *pennsylvanicum* by one- and two-dimensional ^1H - and ^{13}C -NMR spectroscopy. Eur. J. Biochem. 165, 647-652
- Fox GE, Stackebrandt E, Hespell RB, Gibson J, Maniloff J, Dyer TA, Wolfe RS, Balch WE, Tanner RS, Magrum LJ, Zablen LB, Blakemore R, Gupta R, Bonen L, Lewis BJ, Stahl DA, Luehrsen KR, Chen KN und Woese CR (1980): The Phylogeny of prokaryotes. Science 209, 457-463
- Fröman G, Switalski LM, Speziale P und Höök M (1987): Isolation and characterization of a fibronectin receptor from *Staphylococcus aureus*. J. Biol. Chem. 262, 6564-6571
- Fujii H, Kamisango K, Nagaoka M, Uchikawa K, Sekikawa I, Yamamoto K und Azuma I (1985): Structural study on teichoic acids of *Listeria monocytogenes* types 4a and 4d. J. Biochem. 97, 883-891
- Gaillard JL, Berche P und Sansonetti P (1986): Transposon mutagenesis as a tool to study the role of hemolysin in the virulence of *Listeria monocytogenes*. Infect. Immun. 52, 50-55
- Ganfield MCW und Pieringer RA (1975): Phosphatidylkojibiosyl diglyceride. The covalently linked lipid constituent of the membrane lipoteichoic acid from *Streptococcus faecalis* (faecium) ATCC 9790. J. Biol. Chem. 250, 702-709

- Garcia-Bustos JF und Tomasz A (1987): Teichoic acid-containing muropeptides from *Streptococcus pneumoniae* as substrates for the pneumococcal autolysin. *J. Bacteriol.* 169, 447-453
- Garvey JS, Cremer NE und Sussdorf DH (1977): Methods in Immunology, 3d edition, W. A. Benjamin, Inc., Reading, Massachusetts, 313-321
- Geoffroy C, Gaillard JL, Alouf JE und Berche P (1987): Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 55, 1641-1646
- Gibbons RJ und van Houte J (1980): Bacterial adherence and the formation of dental plaques. In: Bacterial Adherence (Beachey EH, ed.), Chapman & Hall, London, New York, 61-104
- Glaser L und Burger MM (1964): The synthesis of teichoic acids. III. Glucosylation of polyglycerophosphate. *J. Biol. Chem.* 239, 3187-3191
- Goldstein IJ, Hay GW, Lewis BA und Smith F (1965): Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction, and hydrolysis. In: Methods in Carbohydrate Chemistry, vol.5 (Whistler RL and DeMiller JN, eds.), Academic Press, New York, 361-370
- Gooderham K (1987): In situ peptide mapping of proteins and polypeptides separated by polyacrylamide gel electrophoresis. *Science Tools* 34, 4-8
- Grant WD (1979): Cell wall teichoic acid as a reserve phosphate source in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 137, 35-43
- Gray ML und Killinger AH (1966): *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol. Rev.* 30, 309-382
- Green MR, Pastewka JV und Peacock AC (1973): Differential staining of phosphoproteins on polyacrylamide gels with a cationic carbocyanine dye. *Anal. Biochem.* 56, 43-51
- Haas R, Koch HU und Fischer W (1984): Alanin turnover from lipoteichoic acid to teichoic acid in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 21, 27-31
- Hammes W, Schleifer KH und Kandler O (1973): Mode of action of glycine on the biosynthesis of peptidoglycan. *J. Bacteriol.* 116, 1029-1053
- Hancock IC, Wiseman G und Baddiley J (1976): Biosynthesis of the unit that links teichoic acid to the bacterial wall: inhibition by tunicamycin. *FEBS Lett.* 69, 75-80

- Hase S und Matsushima Y (1977): The structure of the branching point between acidic polysaccharide and peptidoglycan in *Micrococcus lysodeiicticus* cell wall. J. Biochem. 81, 1181-1186
- Heptinstall S, Archibald AR und Baddiley J (1970): Teichoic acids and membrane function in bacteria. Nature (London) 225, 519-521
- Hether NW und Jackson LL (1983): Lipoteichoic acid from *Listeria monocytogenes*. J. Bacteriol. 156, 809-817
- Hether NW, Campbell PA, Baker LA und Jackson LL (1983): Chemical composition and biological functions of *Listeria monocytogenes* cell wall preparations. Infect. Immun. 39, 1114-1121
- Höltje JV und Tomasz A (1975): Lipoteichoic acid: a specific inhibitor of autolysin activity in *Pneumococcus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1690-1694
- Holligan PM und Drew EA (1971): The routine analysis by gas-liquid chromatography of soluble carbohydrates in extracts of plant tissues. II. Quantitative analysis of standard carbohydrates and the separation and estimation of soluble sugars and polyols from a variety of plant tissues. New. Phytol. 70, 271
- Hugenholtz J, van Sinderen D, Kok J und Konings WN (1987): Cell wall-associated proteases of *Streptococcus cremoris* Wg2. Appl. Environ. Microbiol. 53, 853-859
- Iwasaki H, Shimada A und Ito E (1986): Comparative studies of lipoteichoic acids from several *Bacillus* strains. J. Bacteriol. 167, 508-516
- James AT (1960): Qualitative and quantitative determination of the fatty acids by gas-liquid chromatography. In: Methods of Biochemical Analysis, vol.8 (Glick D, ed.), Interscience Publishers, Inc., New York, 1-59
- Janczura E, Perkins HR und Rogers HJ (1961): Teichuronic acid: a mucopolysaccharide present in wall preparations from vegetative cells of *Bacillus subtilis*. Biochem. J. 80, 82-93
- Jochmus I (1986): Untersuchung der Immunogenität von Oberflächenstrukturen in der Gattung *Listeria*, im Besonderen *Listeria ivanovii*. Diplomarbeit, Universität München
- Jones D (1975): A numerical taxonomic study of coryneform and related bacteria. J. Gen. Microbiol. 87, 52-96
- Kamisango K, Fujii H, Okumura H, Saiki I, Araki Y, Yamamura Y und Azuma I (1983): Structural and immunochemical studies of teichoic acid of *Listeria monocytogenes*. J. Biochem. 93, 1401-1409

- Kathariou S, Metz P, Hof H und Goebel W (1987): Tn916-induced mutations in the hemolysin determinant affecting virulence of *Listeria monocytogenes*. J. Bacteriol. 169, 1291-1297
- Kaufmann SHE (1984): Acquired resistance to facultative intracellular bacteria: relationship between persistence, cross-reactivity at the T-Cell level, and capacity to stimulate cellular immunity of different *Listeria* strains. Infect. Immun. 45, 234-241
- Kaya S, Araki Y und Ito E (1985a): Characterization of a novel linkage unit between ribitol teichoic acid and peptidoglycan in *Listeria monocytogenes* cell walls. Eur. J. Biochem. 146, 517-522
- Kaya S, Araki Y und Ito E (1985b): Structural studies on the linkage unit between poly(galactosylglycerol phosphate) and peptidoglycan in cell walls of *Bacillus coagulans*. Eur. J. Biochem. 147, 41-46
- Kilpper-Bälz R und Schleifer KH (1981): Transfer of *Peptococcus saccharolyticus* Foubert and Douglas to the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus saccharolyticus* (Foubert and Douglas) comb. nov. Zbl. Bakteriell. Mikrobiol. Hyg. Abt. I Orig. C2, 324-331
- Kingdon GC und Sword CP (1970a): Cardiotoxic and lethal effects of *Listeria monocytogenes* hemolysin. Infect. Immun. 1, 373-379
- Kingdon GC und Sword CP (1970b): Effects of *Listeria monocytogenes* hemolysin on phagocytic cells and lysosomes. Infect. Immun. 1, 356-362
- Kloos WE (1980): Natural populations of the genus *Staphylococcus*. Ann. Rev. Microbiol. 34, 559-592
- Kloos WE und Schleifer KH (1981): The genus *Staphylococcus*. In: The Prokaryotes. A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria (Starr HP, Stolp H, Trüper HG, Balows A, and Schlegel HG, eds.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1548-1569
- Kloos WE und Schleifer KH (1986): Genus *Staphylococcus*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol.2 (Butler JP, ed.), Williams & Wilkins, Baltimore, 1013-1035
- Knox KW, Hewett MJ und Wicken AJ (1970): Studies on the group F antigen of lactobacilli: antigenicity and serological specificity of teichoic acid preparations. J. Gen. Microbiol. 60, 303-313
- Knox KW und Wicken AJ (1971): Serological properties of the wall and membrane teichoic acids from *Lactobacillus helveticus* NCIB 8025. J. Gen. Microbiol. 63, 237-248

- Knox KW und Wicken AJ (1973): Immunological properties of teichoic acids. *Bacteriol. Rev.* 37, 215-257
- Koch HU und Fischer W (1978): Acyldiglycosyldiacylglycerol-containing lipoteichoic acid with a poly(3-O-galabiosyl-2-O-galactosyl-sn-glycero-1-phosphate)chain from *Streptococcus lactis* Kiel 42172. *Biochemistry* 17, 5275-5281
- Kojima N, Araki Y und Ito E (1985a): Structure of the linkage units between ribitol teichoic acids and peptidoglycan. *J. Bacteriol.* 161, 299-306
- Kojima N, Araki Y und Ito E (1985b): Structural studies on the acidic polysaccharide of *Bacillus cereus* AHU 1356 cell walls. *Eur. J. Biochem.* 148, 479-484
- Kojima N, Uchikawa K, Araki Y und Ito E (1985c): A common linkage saccharide unit between teichoic acids and peptidoglycan in cell walls of *Bacillus coagulans*. *J. Biochem.* 97, 1085-1092
- Kosaric N und Carroll KK (1971): Phospholipids of *Listeria monocytogenes*. *Biochim. Biophys. Acta* 239, 428-442
- Krause RM und McCarty M (1961): Studies on the chemical structure of the streptococcal cell wall. I. The identification of a mucopeptide in the cell walls of groups A and A-variant streptococci. *J. Exp. Med.* 114, 127-140
- Krause RM und McCarty M (1962): Studies on the chemical structure of the streptococcal cell wall. II. The composition of group C cell walls and chemical basis for serologic specificity of the carbohydrate moiety. *J. Exp. Med.* 115, 49-62
- Kusser W und Fiedler F (1983): Murein type and polysaccharide composition of cell walls from *Renibacterium salmoninarum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 20, 391-394
- Kusser W, Zimmer K und Fiedler F (1985): Characteristics of the binding of aminoglycoside antibiotics to teichoic acids. A potential model system for interaction of aminoglycosides with polyanions. *Eur. J. Biochem.* 151, 601-605
- Lambert PA, Hancock IC und Baddiley J (1977): Occurrence and function of membrane teichoic acids. *Biochim. Biophys. Acta* 472, 1-12
- Lamont RJ, Petrie DT, Melvin WT und Postlethwaite R (1986): An investigation of the taxonomy of *Listeria* species by comparison of electrophoretic protein patterns. In: *Listeriose, Listeria, Listeriosis 1985-86* (Courtieu AL, ed.), *Proc. of the 9th Intern. Symp. on the Probl. of Listeriosis*, Nantes, 41-46

- Lancefield RC (1941): Specific relationship of cell composition to biological activity of hemolytic streptococci. Harvey Lect. 36, 251-290
- Lane FC und Unanue ER (1972): Requirement of thymus (T) lymphocytes for resistance to listeriosis. J. Exp. Med. 135, 1104-1112
- Lederer E (1985): Amphiphile Polymere in der Zellhülle von Clostridien. Diplomarbeit, Universität München
- Lorian V (1975): Some effects of subinhibitory concentrations of penicillin on the structure and division of staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother. 7, 864-870
- Lorian V, Atkinson B, Waluschka A und Kim Y (1982): Ultrastructure, in vitro and in vivo, of staphylococci exposed to antibiotics. Curr. Microbiol. 7, 301-304
- Lüderitz O, Staub AM und Westphal O (1966): Immunochemistry of O and R antigens of *Salmonella* and related *Enterobacteriaceae*. Bacteriol. Rev. 30, 192-255
- Lüderitz O, Freudenberg MA, Galanos C, Lehman V, Rietschel ET und Shaw DH (1982): Lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria. Current Topics in Membranes and Transport 17, 79-151
- Ludwig W, Schleifer KH und Stackebrandt E (1984): 16S rRNA analysis of *Listeria monocytogenes* and *Brochothrix thermosphacta*. FEMS Microbiol. Lett. 25, 199-204
- Lugtenberg B, Meijers J, Peters R, van der Hoek P und van Alphen L (1975): Electrophoretic resolution of the 'major outer membrane protein' of *Escherichia coli* K12 into four bands. FEBS Lett. 58, 254-258
- Mackaness GB (1962): Cellular resistance to infection. J. Exp. Med. 116, 381-406
- Maniatis T, Fritsch EF und Sambrook J (1982): Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Mara MJ, Julak JJ, Kotelko K, Hofman J und Veselska HJ (1980): Phenol-extracted lipopeptidopolysaccharide (LPPS) complex from *Listeria monocytogenes*. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 24, 164-176
- McArthur HAI, Hancock IC und Baddiley J (1981): Attachment of the main chain to the linkage unit in biosynthesis of teichoic acids. J. Bacteriol. 145, 1222-1231
- Merck E (1970): Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie, Merck E, Darmstadt

- Miller GA, Urban J und Jackson RW (1976): Effects of a streptococcal lipoteichoic acid on host responses in mice. *Infect. Immun.* 13, 1408-1417
- Mirelman D, Shaw DRD und Park JT (1971): Nature and origins of phosphorus compounds in isolated cell walls of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 107, 239-244
- Murray EGD, Webb RA, Swann MBR (1926): A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *J. Path. Bacteriol.* 29, 407-439
- Nakano M und Fischer W (1977): The glycolipids of *Lactobacillus casei* DSM 20021. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 358, 1439-1453
- Nakano M und Fischer W (1978): Trihexosyldiacylglycerol and acyltrihexosyldiacylglycerol as lipid anchors of the lipoteichoic acid of *Lactobacillus casei* DSM 20021. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 359, 1-11
- Nasir-ud-din und Jeanloz RW (1976): The chemical structure of a fragment of *Micrococcus lysodeicticus* cell-wall. *Carbohydr. Res.* 47, 245-260
- Neidhardt FC, Bloch PL und Smith DF (1974): Culture medium for enterobacteria. *J. Bacteriol.* 119, 736-747
- Neilands JB (1982): Microbial envelope proteins related to iron. *Ann. Rev. Microbiol.* 36, 285-309
- Oeding P, Myklessted B und Davison AL (1967): Serological investigation on teichoic acids from the wall of *S. epidermidis* and *Micrococcus*. *Acta Path. Microbiol. Scand. B* 69, 458-464
- Ofek I, Simpson WA und Beachey EH (1982): Formation of molecular complexes between a structurally defined M protein and acylated or deacylated lipoteichoic acid of *Streptococcus pyogenes*. *J. Bacteriol.* 149, 426-433
- Op den Camp HJM, Veerkamp JH, Oosterhof A und van Halbeek H (1984): Structure of the lipoteichoic acids from *Bifidobacterium bifidum* spp. *pennsylvanicum*. *Biochim. Biophys. Acta* 795, 301-313
- Ouchterlony O (1968): Handbook of Immunodiffusion and Immunoelectrophoresis, Ann Arbor Sci. Publ., Ann Arbor, Michigan
- Paquet N, Bitutsi F, Espaze EP und Pechere JC (1986): Western blot analysis of surface proteins in *Listeria monocytogenes*. In: *Listeriose, Listeria, Listeriosis 1985-86* (Courtieu AL, ed.), Proc. of the 9th Intern. Symp. on the Probl. of Listeriosis, Nantes, 89-91

- Parrisius J, Bhakdi S, Roth M, Tranum-Jensen J, Goebel W und Seeliger HPR (1986): Production of listeriolysin by beta-hemolytic strains of *Listeria monocytogenes*. Infect. Immun. 51, 314-319
- Paterson JS (1940): The antigenic structure of organisms of the genus *Listerella*. J. Path. Bacteriol. 51, 427-436
- Peel M und Donachie W (1986): Some preliminary studies of surface antigens of *Listeria monocytogenes*. In: Listeriose, *Listeria*, Listeriosis 1985-86 (Courtieu AL, ed.), Proc. of the 9th Intern. Symp. on the Probl. of Listeriosis, Nantes, 92
- Perkins HR (1963): A polymer containing glucose and amino-hexuronic acid isolated from the cell walls of *Micrococcus lysodeikticus*. Biochem. J. 86, 475-483
- Peterson AA und McGroarty EJ (1985): High-molecular-weight components in lipopolysaccharides of *Salmonella typhimurium*, *Salmonella minnesota*, and *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 162, 738-745
- Potekhina NV, Streshinskaya GM, Novitskaya GV und Naumova IB (1983): Isolation of lipoteichoic acid from *Streptomyces levoris*. Mikrobiologiya 52, 340-343
- Powell DA, Duckworth M und Baddiley J (1975): A membrane-associated lipomannan in micrococci. Biochem. J. 151, 387-397
- Raines LJ, Moss CW, Farshtchi D und Pittman B (1968): Fatty acids of *Listeria monocytogenes*. J. Bacteriol. 96, 2175-2177
- Relier JP (1979): Listeriosis. J. Antimicrob. Chemother. 5 (Suppl. A), 51-57
- Rocourt J, Grimont F, Grimont PAD und Seeliger HPR (1982): DNA relatedness among serovars of *Listeria monocytogenes* sensu lato. Curr. Microbiol. 7, 383-388
- Rocourt J und Grimont PAD (1983): *Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 33, 866-869
- Rocourt J, Wehmeyer U, Cossart P und Stackebrandt E (1987a): Proposal to retain *Listeria murrayi* und *Listeria grayi* in the genus *Listeria*. Int. J. Syst. Bacteriol. 37, 298-300
- Rocourt J, Wehmeyer U und Stackebrandt E (1987b): Transfer of *Listeria denitrificans* to a new genus, *Jonesia* gen. nov., as *Jonesia denitrificans* comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 37, 266-270

- Rodriguez GE, McClatchy JK und Campbell PA (1974): Induction of resistance by *Listeria monocytogenes* cell wall fraction. Infect. Immun. 10, 1163-1169
- Roussel-Delvallez M, Drancourt E, Limbert MC und Martin GR (1986): Isolement et purification de cinq antigenes de *Listeria monocytogenes*. In: Listeriose, Listeria, Listeriosis 1985-86 (Courtieu AL, ed.), Proc. of the 9th Intern. Symp. on the Probl. of Listeriosis, Nantes, 83-88
- Ruhland GJ (1984): Untersuchung von amphiphilen Polymeren in der Zellmembran Gram-positiver Bakterien. Diplomarbeit, Universität München
- Ruhland GJ und Fiedler F (1986): Lipoteichoic acids in the genus *Listeria*. In: Listeriose, Listeria, Listeriosis 1985-86 (Courtieu AL, ed.), Proc. of the 9th Intern. Symp. on the Probl. of Listeriosis, Nantes, 47-51
- Ruhland GJ und Fiedler F (1987): Occurrence and biochemistry of lipoteichoic acids in the genus *Listeria*. Syst. Appl. Microbiol. 9, 40-46
- Ryden C, Rubin K, Speziale P, Höök M, Lindberg M und Wadström T (1983): Fibronectin receptors from *Staphylococcus aureus*. J. Biol. Chem. 258, 3396-3401
- Sanderson AR, Strominger JL und Nathenson SG (1962): Chemical structure of teichoic acid from *Staphylococcus aureus*, strain Copenhagen. J. Biol. Chem. 237, 3603-3613
- Schäffler MJ (1982): Chemische Untersuchungen an akzessorischen Zellwandpolymeren bei coryneformen Bakterien. Ein Beitrag zur Taxonomie. Dissertation, Universität München
- Schleifer KH und Kandler O (1967): Zur chemischen Zusammensetzung der Zellwand der Streptokokken. I. Die Aminosäuresequenz des Mureins von *Str. thermophilus* und *Str. faecalis*. Arch. Microbiol. 57, 335-364
- Schleifer KH und Kandler O (1972): Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. Bacteriol. Rev. 36, 407-477
- Schleifer KH, Meyer SA und Rupprecht M (1979): Relatedness among coagulase-negative staphylococci. Deoxyribonucleic acid reassociation and comparative immunological studies. Arch. Microbiol. 122, 93-101
- Schleifer KH (1983): The cell envelope. In: Staphylococci and Staphylococcal Infections, vol.2 (Easmon CSF and Adlam C, eds.), Academic Press, New York, 385-428
- Schleifer KH, Kraus J, Dvorak C, Kilpper-Bälz R, Collins MD und Fischer W (1985): Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. Syst. Appl. Microbiol. 6, 183-195

- Schwab JH (1975): Suppression of the immune response by microorganisms. *Bacteriol. Rev.* 39, 121-143
- Seeliger HPR (1961): *Listeriosis*, 2nd edition, Karger, Basel, New York
- Seeliger HPR und Bockemühl J (1968): Kritische Untersuchungen zur Frage einer Kapselbildung bei *Listeria monocytogenes*. *Zbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. I. Abt. Orig.* 206, 216-227
- Seeliger HPR und Welshimer HJ (1974): Genus *Listeria* Pirie 1940. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th edition (Buchanan RE and Gibbons NE, eds.), Williams & Wilkins, Baltimore, 593-596
- Seeliger HPR (1975): Serovars of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species. In: *Problems of Listeriosis* (Woodbine M, ed.), Leicester University Press, Leicester, England, 27-29
- Seeliger HPR (1976): Notion actuelle sur l'épidémiologie de la listériose. *Medicine et Maladies Infectieuses* 6, 6-14
- Seeliger HPR und Höhne K (1979): Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. In: *Methods in Microbiology*, vol.13 (Bergan T and Norris JR, eds.), Academic Press, New York, 31-49
- Seeliger HPR (1981): Apathogene Listerien: *Listeria innocua* sp. n. *Zbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. I. Abt. Orig. A* 249, 487-493
- Seeliger HPR, Rocourt J, Schrettenbrunner A, Grimont PAD und Jones D (1984): *Listeria ivanovii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34, 336-337
- Seeliger HPR und Jones D (1986): Genus *Listeria* Pirie 1940. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2 (Butler JP, ed.), Williams & Wilkins, Baltimore, 1235-1245
- Sharpe ME, Davison AL und Baddiley J (1964): Teichoic acids and group antigens in lactobacilli. *J. Gen. Microbiol.* 34, 333-340
- Shaw N (1970): Bacterial glycolipids. *Bacteriol. Rev.* 34, 365-377
- Siddiqi R und Khan MA (1982): Vitamin and nitrogen base requirements for *Listeria monocytogenes* and haemolysin production. *Zbl. Bact. Hyg. I. Abt. Orig. A* 253, 225-235
- Singh SP, Moore BL und Siddique IH (1981): Purification and further characterization of phenol extract from *Listeria monocytogenes*. *Am. J. Vet. Res.* 42, 1266-1268

- Siromashkova M, Ivanov I, Manev C und Masalsky N (1986): Studies of the lipopolysaccharides of the virulent and attenuated strains of *Listeria monocytogenes*. In: Listeriose, *Listeria*, Listeriosis 1985-86 (Courtieu AL, ed.), Proc. of the 9th Intern. Symp. on the Probl. of Listeriosis, Nantes, 52-55
- Sjöquist J, Meloun B und Hjelm H (1972): Protein A isolated from *Staphylococcus aureus* after digestion with lysostaphin. Eur. J. Biochem. 29, 572-578
- Smith H (1976): Survival of vegetative bacteria in animals. Symp. Soc. Gen. Microbiol. 26, 299-326
- Smith H (1977): Microbial surfaces in relation to pathogenicity. Bacteriol. Rev. 41, 475-500
- Spurr AR (1969): A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res. 26, 31-43
- Stackebrandt E, Häringer M und Schleifer KH (1980): Molecular genetic evidence for the transfer of *Oerskovia* species into the genus *Cellulomonas*. Arch. Microbiol. 127, 179-185
- Stackebrandt E, Ludwig W, Weizenegger M, Dorn S, McGill TJ, Fox GE, Woese CR, Schubert W und Schleifer KH (1987): Comparative 16S rRNA oligonucleotide analyses and murein types of round-spore-forming bacilli and non-spore-forming relatives. J. Gen. Microbiol. 133, 2523-2529
- Stahl E (1967): Dünnschichtchromatographie, 2. Aufl., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Steppich H (1985): Biochemische Untersuchungen an amphiphilen Polymeren von Propionibakterien. Diplomarbeit, Universität München
- Stuart SE und Welshimer HJ (1973): Intrageneric relatedness of *Listeria* Pirie. Int. J. Syst. Bacteriol. 23, 8-14
- Stuart SE und Welshimer HJ (1974): Taxonomic reexamination of *Listeria* Pirie and transfer of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a new genus *Murraya*. Int. J. Syst. Bacteriol. 24, 177-185
- Tempest DW, Dicks JW und Ellwood DC (1968): Influence of growth condition on the concentration of potassium in *Bacillus subtilis* var. *niger* and its possible relationship to cellular ribonucleic acid, teichoic acid and teichuronic acid. Biochem. J. 106, 237-243
- Toon P, Brown PE und Baddiley J (1972): The lipid-teichoic acid complex in the cytoplasmic membrane of *Streptococcus faecalis* N.C.I.B 8191. Biochem. J. 127, 399-409

- Towbin H, Staehelin T und Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354
- Trippen B, Hammes WP, Schleifer KH und Kandler O (1976): Die Wirkung von D-Aminosäuren auf die Struktur und Biosynthese des Peptidoglycans. *Arch. Microbiol.* 109, 247-261
- Uchikawa K, Sekikawa I und Azuma I (1986a): Structural studies on lipoteichoic acids from four *Listeria* strains. *J. Bacteriol.* 168, 115-122
- Uchikawa K, Sekikawa I und Azuma I (1986b): Structural studies on teichoic acids in cell walls of several serotypes of *Listeria monocytogenes*. *J. Biochem.* 99, 315-327
- Ullmann WW und Cameron JA (1969): Immunochemistry of the cell walls of *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 98, 486-493
- Ward JB (1981): Teichoic and teichuronic acids: biosynthesis, assembly, and location. *Microbiol. Rev.* 45, 211-243
- Weber K und Osborn M (1969): The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412
- Weidel W und Pelzer H (1964): Bagshaped macromolecules - a new outlook on bacterial cell walls. *Adv. Enzymol.* 26, 193-232
- Westphal O und Jann K (1965): Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. In: *Methods in Carbohydrate Chemistry*, vol. 5 (Whistler RL and DeMiller JN, eds.), Academic Press, New York, 83-91
- Wexler H und Oppenheim JD (1979): Isolation, characterization, and biological properties of an endotoxin-like material from the Gram-positive organism *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 23, 845-857
- Wexler H und Oppenheim JD (1980): *Listeria* LPS: an endotoxin from a Gram-positive bacterium. In: *Bacterial Endotoxins and Host Response* (Agarwal MK, ed.), Biomedical Press, Elsevier, North-Holland, 27-50
- Wicken AJ (1966): The glycerol teichoic acid from the cell wall of *Bacillus stearothermophilus* B65. *Biochem. J.* 99, 108-116
- Wicken AJ und Knox KW (1970)): Studies on the group F antigen of lactobacilli: isolation of a teichoic acid-lipid complex from *Lactobacillus fermenti* NCTC 6991. *J. Gen. Microbiol.* 60, 293-301

- Wicken AJ, Gibbens JW und Knox KW (1972): Antiteichoic acid antibodies and nontreponemal serological tests for syphilis. *Infect. Immun.* 5, 982-984
- Wicken AJ und Knox KW (1975): Lipoteichoic acids: a new class of bacterial antigen. *Science* 187, 1161-1167
- Wicken AJ und Knox KW (1977): Biological properties of lipoteichoic acids. In: *Microbiology* (Schlessinger D, ed.), American Society for Microbiology, Washington DC, 360-365
- Wicken AJ, Broady KW, Evans JD und Knox KW (1978): New cellular and extracellular amphipathic antigen from *Actinomyces viscosus* NY1. *Infect. Immun.* 22, 615-616
- Wicken AJ (1980): Structure and cell membrane-binding properties of bacterial lipoteichoic acids and their possible role in adhesion of streptococci to eukaryotic cells. In: *Bacterial Adherence* (Beachey EH, ed.), Chapman & Hall, London, New York, 137-158
- Wicken AJ und Knox KW (1980): Bacterial cell surface amphiphiles. *Biochim. Biophys. Acta* 604, 1-26
- Wilkinson SG und Galbraith L (1975): Studies of lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur. J. Biochem.* 52, 331-343
- Wilkinson BJ und Jones D (1977): A numerical taxonomic survey of *Listeria* and related bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 98, 399-421
- Woese CR (1987): Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221-271

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Franz Fiedler für die wohlwollende wissenschaftliche Förderung, das große Interesse an dieser Arbeit und seine zahlreichen wertvollen Ratschläge.

Frau Caroline Heitmeier und Frau Isa Schobert danke ich für die sorgfältige Assistenz bei vielen Versuchen.

Herzlich danken möchte ich auch Herrn Dr. Gerhard Wanner vom Botanischen Institut der Universität München für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Für die großzügige Bereitstellung von Anti-Listeria-Seren danke ich Herrn Prof. Dr. H. P. R. Seeliger vom Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg.

Allen Kollegen am Lehrstuhl Mikrobiologie, insbesondere den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. F. Fiedler, danke ich für die Hilfsbereitschaft und freundliche Zusammenarbeit.

LEBENS LAUF

Name:	Gerhard Josef Ruhland
Geburtstag, Geburtsort:	03.06.56 in München
Eltern:	Josef Ruhland (Kalkulator) und Ernestine Ruhland (Kauffrau)
Schulbildung:	
1962-1966	Grundschule in München
1966-1975	Erasmus-Grasser-Gymnasium (math.-naturw.) in München, Abitur
Bundeswehr:	
1975-1976	Grundwehrdienst
Studium und Beruf:	
1976-1984	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, Diplom
1984-1988	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität München unter Leitung von Herrn Prof. Dr. F. Fiedler
seit Mai 1988	Akad. Rat a. Z. am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universi- tät München

